



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Oncologia Clinica e Molecolare

Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche

Direttore Prof. F. Moschella Med/19

**MELANOMA FAMILIARE. ANALISI DEI RISULTATI
DELLO SCREENING DELLA MUTAZIONE DEL GENE
CDKN2A NELLA POPOLAZIONE SICILIANA.**



Tesi della

Dott.ssa Sara Di Lorenzo

Il Coordinatore

Chiar.ma Prof.ssa Giuseppina Campisi

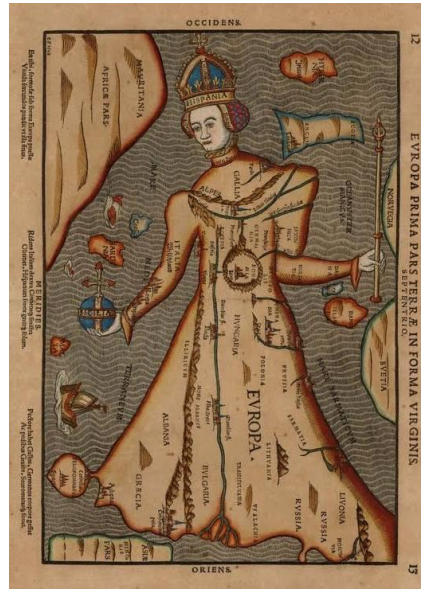
Il Tutor

Chiar.ma Prof.ssa Adriana Cordova

Indice

Storia del Melanoma Familiare	pag. 3
Melanomagenesi e dintorni	pag. 7
- modello di tumori genesi lineare	
- modello di tumori genesi non lineare	
Classificazione molecolare del melanoma	pag 12
Epidemiologia e fattori di rischio	pag. 14
fattori di rischio esogeni/ambientali	pag.15
-fattori di rischio endogeni e melanoma ereditario	pag. 17
Melanoma familiare	pag.20
Geni di suscettibilità	pag.23
MC1R	pag. 24
MITF	pag. 26
Geni a bassa penetranza	pag. 28
GENI ad ALTA penetranza: CDK4 e CDKN2A	pag. 29
Perché è importante identificare i melanomi familiari e i carrier delle mutazioni ad alta penetranza?	pag. 37
Dati relativi all'Italia	pag. 39
Materiali e metodi	pag. 41
- analisi di sequenziamento	pag. 44
Risultati	pag. 45
Conclusioni	pag. 52
Bibliografia	pag. 58
Presentazioni a Congressi e pubblicazione dei risultati dello studio	pag. 68

Ai miei amori
Virginia, Antonio, Bartolo
e alla mia amata terra



I risultati dello screening sembrano confermare la diversità genetica della Sicilia (rappresentata nell'immagine sulla mano destra della vergine Europa) rispetto al resto d'Europa e dell'Italia. L'elevato livello di eterozigosità genetica, documentata da numerosi studi antropologici-genetici, trova una valida spiegazione nella storia della Sicilia che è stata sempre, per la sua posizione geografica, un punto di passaggio e di incontro di gruppi mediterranei con effetti però diversi all'interno dell'isola. La Sicilia è stata nel corso della sua storia teatro di numerose invasioni e dominazioni con influssi culturali e genetici di popolazioni diverse. Nell'area orientale ancora oggi è possibile rintracciare influssi genetici derivanti dalla dominazione greca, mentre nella parte occidentale si conservano tracce della presenza dei Fenici, dei Normanni e degli Arabi. (Da Analisi molecolare delle popolazioni del Mediterraneo attraverso 11 inserzioni Alu. Carla Maria Calò et al. 2005. Antropo, 9, 1-12. www.didac.ehu.es/antropo).

“As to the remote and exciting causes of melanosis, we are quite in the dark, nor can more be said of the methodus medendi. We are hence forced to confess the incompetency of our knowledge of the disease under consideration, and to leave to future investigators the merit of revealing the laws which govern its origin and progress....and pointing out the means by which its ravages may be prevented or repressed” –

Thomas Fawdington, The Manchester Royal Infirmary, 1826.

Quando Thomas Fawdington scrisse queste parole nel 1826, la scienza medica aveva ben poco da offrire ai malati di melanoma. Il concetto di ereditarietà e di DNA non esistevano così come ancora non si era capito che i tumori originassero dalla trasformazione di cellule normali. Tra 1650-1760 la letteratura medica europea riportava "tumori neri fatali con metastasi... liquido nero nel corpo...", ma uno dei primi report più dettagliati e approfonditi sulla eziologia e la progressione del melanoma risale a William Norris (1820), un medico generico di Stourbridge (Inghilterra).

William Norris descrisse il caso di un paziente di 59 anni, seguito per un periodo di 3 anni, documentando l'evoluzione clinica della malattia e descrivendo i reperti autoptici del paziente deceduto. Descrisse l'aspetto macroscopico della lesione primaria e delle lesioni similari riscontrate in altri organi. Sulla base delle sue osservazioni cliniche e dei suoi rilievi anatomici ipotizzò che questa patologia avesse la spiccata tendenza ad

interessare organi a distanza. E 'stato uno dei primi a proporre un rapporto tra nevi e melanoma e un possibile legame tra l'insorgenza di melanoma e l'esposizione a fattori ambientali (come l'inquinamento industriale). Nei suoi rilievi autoptici descrisse forme di melanoma pigmentate e forme amelaniche sottolineando la tendenza alla diffusione metastatica di queste lesioni ai principali organi e apparati. Norris osservò inoltre che nessun trattamento chirurgico o medico risultava efficace, una volta che la malattia fosse già metastatica. Sostenne, pioniere della chirurgia del melanoma, che solo un'ampia escissione del melanoma poteva controllarne la recidiva locoregionale.

Cosa più importante di tutte però, (e questo è il motivo per cui mi sono permessa di iniziare la mia tesi con una introduzione storica alla malattia) Norris fu il primo a notare la natura ereditaria di alcune forme di melanomi, 50 anni prima che Mendel presentasse i suoi studi sulla ereditarietà. Norris sottolineò nel suo report che il padre del paziente deceduto per melanoma era morto per una patologia simile, che verosimilmente aveva avuto origine da un nevo. L'osservazione che i figli del paziente avevano, come il padre e il nonno, molti nevi, carnagione e capelli chiari lo aveva portato a credere che ci fosse una certa ereditarietà nella trasmissione della neoplasia; con ogni probabilità Norris descrisse per primo un caso di Melanoma Familiare.

Uno dei più significativi passi avanti nella comprensione della melanomagenesi è stata la scoperta che i tumori potessero insorgere in seguito a mutazioni genetiche di cellule normali (1911, Peyton Rous e i suoi studi sul sarcoma di pollo).

Nei primi anni '80 sono stati scoperti gli oncogeni della famiglia RAS che hanno dato inizio alla "Oncogene Revolution" che ha rimodulato la biologia dei tumori e del melanoma del XXI secolo.

Le osservazioni di Norris furono trascurate dal mondo scientifico fino al 1952, epoca in cui Cawley descrisse un caso di melanoma familiare

aprendo nuovamente l'interesse verso questa patologia. Attraverso una revisione della letteratura scientifica che includeva studi su modello animale di melanoma (pesci, rettili, roditori, cavalli) notò che anche nelle specie animali vi era un meccanismo ereditario di trasmissione del melanoma. I pochi casi descritti non consentivano però di ipotizzare un meccanismo di trasmissione di tipo Mendeliano.

Al 1970 risale invece la prima descrizione di due gemelli monozigoti con melanomi cutanei insorti giovane età. Sempre in quegli anni, un approccio più sistematico fu quello di Anderson che revisionando le cartelle cliniche di 2164 pazienti con melanoma operati presso l'Anderson Hospital, identificò 36 forme familiari e ipotizzò, dall'analisi degli alberi genealogici, che il meccanismo di trasmissione ereditaria del melanoma fosse probabilmente di tipo autosomico dominante, con una modalità più complessa o multifattoriale. Queste ipotesi nascevano dall'osservazione che non tutti i figli del probando presentavano melanoma. Ipotizzò che ci doveva essere qualcosa (anche un fattore esterno) che favoriva il fenotipo della malattia nei pazienti che erano carrier della mutazione dominante (quella che oggi viene identificata con fattore secondario responsabile della LOH, perdita dell'eterozigosi della mutazione germinale, secondo l'ipotesi di Knudson). (*Greene et Bale, 1986*). Anche Wallac, 1973, non riuscì a definire se il meccanismo di trasmissione fosse poligenico o autosomico dominante a penetranza variabile. (Wallace et al, 1973)

Seguiranno in quegli anni gli studi su pazienti con nevi displastici e melanoma e l'identificazione della sindrome ereditaria del nevo displastico (syndrome BK, DNS, FAMMM). I pazienti con melanoma familiare non sempre presentavano nevi displastici, e questo portò ad una ulteriore caratterizzazione nosografica della malattia.

Il ruolo etiopatogenetico delle radiazioni UV fu ipotizzato per la prima volta nel 1956 da Henry Lancaster, un matematico australiano, che notò l'aumentata incidenza del melanoma nelle popolazioni caucasiche residenti in Australia. Successivamente Nelson trovò una correlazione tra fototipo

cutaneo e melanoma, evidenziando come i fototipi chiari, di discendenza celtica migrati in aree geografiche come Australia , Nuova Zelanda fossero più prone a sviluppare melanoma.

Seguirono quindi gli studi pionieristici di Clark (1966) e Breslow (1970) che classificarono il melanoma in relazione al livello di infiltrazione tumorale e la stadiazione del melanoma secondo I criteri prognostici istopatologici da loro individuati, fu standardizzata e rappresenta ancora oggi la base del sistema classificativo dell'AJCC staging system. *(Rebecca W. et al. 2012)*

Melanomagenesi e dintorni

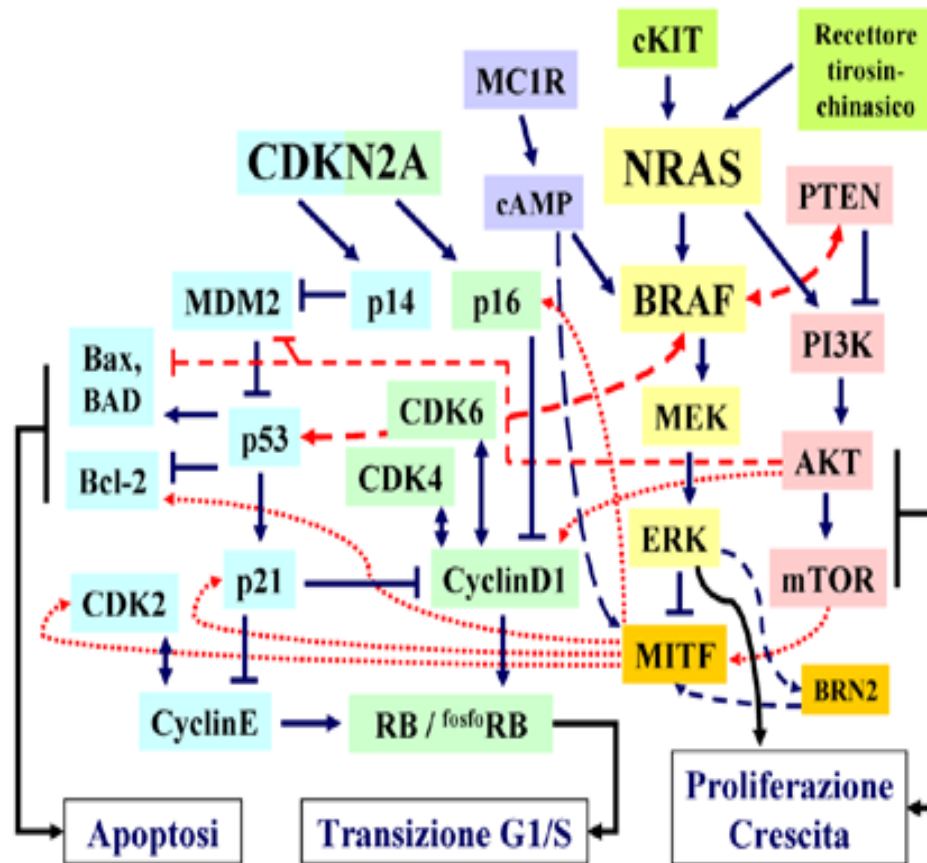


Il melanoma è una patologia complessa ed eterogenea alla cui patogenesi concorrono fattori genetici, individuali ed ambientali.

L'aumentata incidenza di melanoma nel mondo occidentale ha portato questo tumore al centro della ricerca oncologica. Negli ultimi anni, è stato dimostrato che il melanoma è caratterizzato da una spiccata eterogeneità molecolare, notevolmente maggiore a quella finora evidenziata dal punto di vista istopatologico.

La patogenesi del melanoma, come di tutte le altre forme di neoplasie maligne, è basata sull'acquisizione di alterazioni sequenziali a carico di specifiche regioni di DNA e/o di particolari meccanismi coinvolti nella regolazione del funzionamento cellulare; la ricerca biomolecolare ha infatti consentito di caratterizzare la tumorigenesi come un processo ad accumulo di mutazioni specifiche che alterano specifici *pathway* metabolico-

molecolari (Held M, et al, 2010).



Principali **pathway** coinvolti nella patogenesi del melanoma. Da www.isst.it, basi scientifiche per le linee guida del Ministero della Salute.

Studi di citogenetica hanno permesso di identificare mutazioni di geni coinvolti in pathway di regolazione del ciclo cellulare come NRAS-BRAF (MAPK e PI3K-AKT pathway), cKIT e MITF e CDKN2A (p16^{CDKN2A}-CDK4-RB e p14^{CDKN2A}-MDM2-p53 pathway) (Swick JM et al. 2012).

Studi successivi hanno correlato il tipo di mutazione genetica con la variante clinico-patologica del melanoma evidenziando una grande

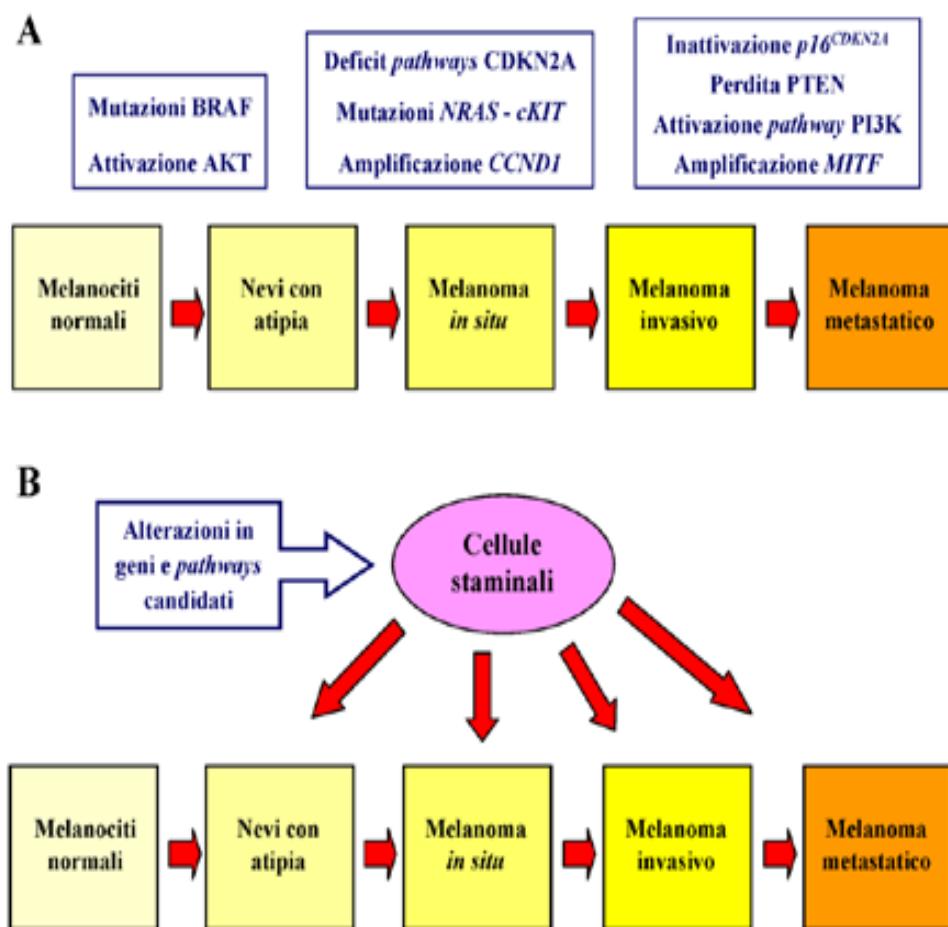
eterogeneità nell'ambito dei melanomi. Queste evidenze hanno spinto ad elaborare una classificazione molecolare del melanoma, che, oggi, ha l'obiettivo, nei pazienti in stadio avanzato di malattia, di individualizzare le terapie, identificando sottogruppi di pazienti che potrebbero beneficiare di una terapia target specifica piuttosto che una altra. Questo è una delle ragioni del maggiore interesse oggi per lo studio del melanoma familiare.

L'insieme delle attuali informazioni sui singoli pathway coinvolti è fortemente indicativa dell'esistenza di complessi meccanismi molecolari di regolazione, che provvedono a garantire l'integrità e la regolarità delle diverse funzioni cellulari nei melanociti normali. La progressione dai melanociti normali a melanociti neoplastici, fino ad arrivare alla formazione delle cellule aggressive e metastatiche, è pertanto il risultato di eventi che aumentano o riducono l'attività di vari pathway molecolari. Recentemente è stato così sviluppato un modello di **melanomagenesi di tipo lineare** che risulta basato sull'accumulo progressivo delle alterazioni molecolari descritte in precedenza.

Inoltre è stata ipotizzata l'esistenza, in un numero non ancora quantificato di casi, di una **seconda via di trasformazione neoplastica melanocitaria (di tipo "non lineare")**, che vede il coinvolgimento di cellule staminali tessutali, le cui alterazioni darebbero direttamente origine a cellule di melanoma in fase di crescita superficiale oppure verticale ovvero, addirittura, in fase metastatica. Questa seconda ipotesi si basa sull'evidenza di alcune incongruenze del modello di tumorigenesi progressiva in alcuni sottogruppi melanomi a crescita verticale rispetto a quelli a crescita superficiale, nonché sull'osservazione di amplificazioni delle regioni genomiche 9p21 e 1p22 in maniera prevalente nei melanomi nodulari. (Zabierowski SE, 2008; Fukunaga-Kalabis M et al, 2011;)

Questo aspetto a mio avviso è molto importante, specie nei melanomi familiari negativi per la mutazione dei geni ad alta penetranza, in cui non è stata identificata ancora una mutazione specifica responsabile della ereditarietà della neoplasia (vedi sezione conclusioni). Dimostrare che la

presenza di una specifica mutazione o di una alterazione di un pathway specifico possa indurre l'insorgenza di un melanoma spesso, a crescita verticale d'emblee e che una altra mutazione induca invece la comparsa solo di un melanoma sottile che non tende, se non tardivamente, alla crescita verticale, potrebbe consentire di individuare sottotipi di melanomi con prognosi nettamente differente l'uno dall'altro e che possano beneficiare di terapie target individualizzate e specifiche, anche non in stadi avanzati della malattia (chemioprevenzione?).



Modelli di sviluppo e progressione del melanoma. A modello di melanomagenesi di tipo sequenziale. B modello non lineare. (da www.isst.it)

Queste ipotesi patogenetiche e le evidenti eterogeneità molecolari devono fare pensare a differenti sottotipi di melanoma, con

comportamento biologico differente e far abbandonare il concetto di melanoma, dal punto di vista biologico, come una unica neoplasia.

La classificazione molecolare del melanoma è destinata a divenire sempre più complessa e soppianderà totalmente la più restrittiva classificazione istocitopatologica

Classificazione molecolare del melanoma

<i>Mutazione</i>	<i>Percentuale di melanomi con mutazione</i>	<i>Associazioni fenotipiche</i>
<i>BRAF</i>	50%	Età giovanile Esposizione solare intermittente Tronco, estremità Elevato numero di nevi melanocitici Poche lentiggini Facilità ad abbronzarsi Istotipo melanoma a diffusione superficiale
<i>NRAS</i>	15-20%	Esposizione solare intermittente (debole associazione) Assente o scarsa diffusione pagetoide Circoscrizione periferica
<i>cKIT</i>	2% (10-20% dei melanomi acrali e melanomi mucosali)	Sedi acrale e mucosale Istotipo melanoma acrale-lentiginoso e melanomi mucosali
<i>GNAQ/GNA11</i>	40-50% dei melanomi uveali; melanomi tipo nevi blu?	Melanoma uveale

Tabella tratta Da www.iss.it del ministero della Salute

Lo studio delle correlazioni tra tipo di mutazione genetica e le caratteristiche istopatologiche (*Viros et al, 2008*) del melanoma ha dimostrato che

- i melanomi che insorgono nelle tronco e nelle sedi corporee esposte al sole o ai raggi UV in maniera intermittente (sedi di abbronzatura da spiaggia o da lettino abbronzante) sono SSM e presentano mutazioni BRAF. (*Bauer J. 2011*)

- I melanomi insorti su cute con elastosi solare, ovvero segni di esposizione cronica ai raggi del sole (braccia, testa-collo) presentano mutazioni di c.kit o Nras, e solo in misura minore del BRAF. (*Bauer J. Et al 2011; Limon J. Et al, 2013*)

- i melanomi nodulari non presentano mutazioni genetiche caratteristiche, avvalorando l'ipotesi che il melanoma nodulare abbia una origine differente e non sia assimilabile agli altri istotipi di melanoma. (Curtin JA. Et al, 2005; 2006)

Nell'era della *target therapy*, diventa quindi fondamentale capire i complicati meccanismi biologici che sono alla base dello sviluppo e della progressione del melanoma, per poter classificare dal punto di vista molecolare il tumore ed indirizzare il paziente verso la terapia più adeguata per il proprio tipo di aberrazione genetico-molecolare.

Epidemiologia e fattori di rischio

Nel mondo, il melanoma cutaneo è al 16° posto tra i tumori più frequenti negli uomini ed al 17° posto nelle donne. Negli ultimi 40 anni, l'incidenza del melanoma è aumentata, soprattutto tra la popolazione di razza bianca. Nei Paesi dell'Europa centrale, i tassi di incidenza sono passati da 3-4 casi per 100.000 a 10-15 casi per 100.000 abitanti.

Lo studio dei *trend* d'incidenza indica che nei Paesi occidentali i tassi continueranno ad aumentare anche nelle prossime due decadi, e ha portato a parlare di "epidemia di melanoma". I tassi di mortalità sembrano invece non aumentare rispecchiando verosimilmente un miglioramento nella diagnosi precoce. Nonostante il melanoma rappresenti il 2-3% del totale dei tumori (esclusa cute non melanoma), risulta ai primi posti in termini di frequenza nei soggetti di età < 50 anni, tra i quali rappresenta l'8-10% del totale in entrambi i sessi (*Linee guida Aiom, 2013*).

Le motivazioni di questo trend di incidenza in aumento non sono ancora ben note. Cambiamenti dello stile di vita e ragioni ambientali (buco nell'ozono? inquinamento?) sembrano i principali responsabili di questa aumentata incidenza di melanomi. I fattori di rischio per lo sviluppo del melanoma cutaneo sono legati a fattori ambientali e fattori correlati alle caratteristiche specifiche dell'individuo.

Fattori di rischio esogeni/ambientali

Esposizione a
raggi UV solari (scottature)
Raggi UVB/UVA (lettini abbronzanti)
radiazioni ionizzanti
PCBS
Polveri metalliche
Arsenico
Metalli pesanti (litografie)
Radiazioni cosmiche

Tra i fattori esogeni-ambientali l'esposizione solare è determinante nell'etiologia del melanoma (*Jhappan et al, 2003*), come conferma il dato relativo agli elevati tassi di incidenza nelle aree geografiche tropicali abitate da popolazioni di origine del Nord Europa, di carnagione chiara, ovvero inadatte in termini di evoluzione, a quel tipo di ambiente.

Esiste una chiara correlazione tra melanoma e popolazione di pelle bianca, con occhi chiari e capelli biondi, tra la durata di vita trascorsa a basse latitudini e maggiore incidenza di melanoma, tra rischio di melanoma ed intensa ed intermittente esposizione solare, propria delle attività ricreative.

Tra gli altri fattori ambientali potenzialmente responsabili dell'insorgenza di melanoma si elencano: esposizione a solventi organici (*Lunderber, 1993; Langard, 2000; Loomis et al. 1997*), radiazioni ionizzanti (*Wennborg, 2001; Ron, 1998; Sigurson 2003; Tellelamberton 2004; Son E. 2001*) , PCBS, radiazioni cosmiche (*Haldorsen T. et al 2001; Pukkala 2002, 2003*), arsenico(*Guo X. et al, 2006; Chen Y. Et al, 2007*) , metalli pesanti (*Sarna et al, 1980*), polveri metalliche (litografie), (*Dubrow R. et al 1986*).

In Italia è stata dimostrata un'associazione significativa tra l'esposizione professionale e ambientale al PBC prodotto nell'industria Caffaro di Brescia, chiusa negli anni 80. Dati epidemiologici evidenziano una incidenza di melanoma più che triplicata negli ultimi 15 anni e studi caso controllo hanno evidenziato un chiaro rapporto dose-risposta.

Fattori di rischio endogeni e Melanoma ereditario

La maggior parte dei casi il melanoma è sporadico, ovvero insorge in soggetti con ogni probabilità esposti a fattori di rischio ambientale come raggi uv e radiazioni etc (in misura minore).

In una piccola percentuale di casi il melanoma è ereditario, ovvero insorge in individui appartenenti alla stessa famiglia:

- Carrier (ovvero individui portatori) di comuni varianti genetiche associate ad una leggermente maggiore incidenza di melanoma,rispetto alla popolazione generale (tipo soggetti con fototipo chiaro) o
- in famiglie carrier di mutazioni specifiche responsabili dell'insorgenza di varie patologie tumorali e non (es. sindromi tumorali eredofamiliari e patologie dermatologiche ereditarie) o
- in famiglie carrier di mutazioni specifiche che inducono l'insorgenza del solo melanoma (melanoma familiare propriamente detto)(*Daniell C et al, 2011*)

Fattori di rischio endogeni/individuali
Etnia (caucasici)
Fototipo chiaro (I-III sec Fitzpatrick)
Condizioni di immunodepressione (leucemie, farmaci, etc)
Presenza di numerosi nevi comuni (>50) o atipici/displastici, sindrome del nevo displastico
FAMMM (familial Atypical Multiple Mole-Melanoma Syndrome)
Xeroderma pigmentoso
Albinismo
Neoplasie eredofamiliari non specifiche per melanoma : neoplasie mammella ovaio BRCA1-2 correlata, Sindrome di Li-Fraumeni,

Retinoblastoma,
sindrome di Werner,
sindr. Di Cowden
sdr melanoma –astrocitoma

Nell'ambito dei melanomi ereditari bisogna distinguere quindi i melanomi che insorgono in pazienti affetti da sindromi neoplastiche ereditarie complesse, in cui il melanoma non rappresenta comunque la neoplasia principale, ma è una delle neoplasie che possono verificarsi in questi pazienti, dalle forme di melanoma insorte in pazienti affetti da condizioni patologiche complesse in cui è alta comunque la probabilità che si manifesti un melanoma, e, in ultimo, dalle forme di melanoma familiare propriamente detto, in cui l'unica neoplasia che realmente si presenta in questi soggetti è solo il melanoma.

Esistono sindromi neoplastiche eredo-familiari in cui specifiche mutazioni espongono il paziente all'insorgenza di vari tumori solidi e, in misura minore, anche di melanoma. Ad esempio:

- La Breast Cancer Linkage Consortium ha evidenziato un maggiore rischio di melanoma nei pazienti carrier della mutazione BRCA2, che induce le neoplasie di mammella e ovaio. (*the Breast Cancer Linkage Consortium, 1999*); come riportato nella sezione risultati di questa tesi, anche dall'analisi dei risultati del nostro studio è emerso che la mutazione BRCA predispone all'insorgenza di melanoma.
- nella sindrome di LiFraumeni, in cui è presente la mutazione del gene per la p53, (trasmissione autosomica dominante) oltre ai sarcomi, tumori mammari, encefalici e surrenalici, si è evidenziata una aumentata incidenza di melanomi;
- lo stessa maggiore incidenza di melanomi si è riscontrata nei pazienti con retinoblastoma,
- sindrome di Werner,
- sindrome di Cowden etc..

Altre condizioni patologiche ereditarie in cui è alta la probabilità che insorga il melanoma sono

- la sindrome del nevo displastico familiare (FAMMM),
- lo xeroderma pigmentoso e
- l'albinismo.

melanoma familiare

L'evidenza clinica che il melanoma insorge nel 10-12% dei casi in contesti familiari e che il 3-5% dei soggetti con un melanoma primario svilupperà un secondo melanoma nell'arco della propria vita ha portato i ricercatori nel corso degli ultimi vent'anni a parlare di Melanoma familiare e a focalizzare l'attenzione su studi di citogenetica e biologia molecolare che hanno permesso di identificare alcune alterazioni genetiche correlate al melanoma cutaneo in contesti familiari.

La familiarità costituisce un importante fattore di rischio; per il melanoma, come per gli altri tumori, avere familiari di primo grado affetti da melanoma determina, nei consanguinei, un rischio aumentato di sviluppare la stessa malattia nell'arco della vita. (*Sargen M.et al, 2014; Goldstein A., 2007*).

La diagnosi presuntiva di Melanoma familiare, secondo i criteri indicati dalla Società Italiana di Genetica Umana (*SIGU-ONC, Sezione Linee guida, protocolli <http://www.sigu.net>*) e dalla Genomel Consortium (*Leachman SA. 2009*), viene formulata quando alla anamnesi personale e familiare si rilevano:

- a) due o più casi di melanoma nello stesso ramo della famiglia.
- b) È già nota una mutazione in un gene di suscettibilità al melanoma (es. CDKN2A, CDK4);
- c) Presenza di melanoma multiplo;
- d) sindrome del nevo displastico (o nevo atipico) e melanoma (nel paziente con DNS o nei familiari);
- e) presenza di melanoma in giovane età e di un familiare con carcinoma del Pancreas (alcune forme sono correlate con la mutazione del CDKN2A).

Nelle popolazioni a bassa incidenza di melanoma (come il Sud Europa) si parla di melanoma familiare quando vi siano almeno 2 parenti di primo grado affetti da melanoma o 3 membri affetti parenti di secondo grado nello stesso ramo dell'albero genealogico (*Bruno et al, 2009*); mentre nelle aree geografiche ad alta incidenza, come Nord Europa, Stati Uniti ed Australia, si parla di familiarità se ci sono almeno 3 membri affetti parenti di primo grado nella stessa famiglia.

Per la popolazione italiana è stato stimato che individui appartenenti a famiglie con più casi di melanoma hanno un rischio di ammalarsi di circa 50 e 25 volte superiore rispetto alla popolazione generale a seconda che sia rispettivamente presente o assente l'alterazione genetica.

Come per altre neoplasie, i geni coinvolti nella predisposizione al melanoma, codificano per proteine che controllano direttamente il ciclo cellulare e che, se mutati a livello germinale, aumentano in modo significativo il rischio dell'individuo di sviluppare il melanoma.

Come detto in precedenza l'etiopatogenesi del melanoma è multifattoriale, ovvero giocano un ruolo fattori genetici in sinergia con i fattori ambientali.

Sembra infatti da evidenze cliniche che la sola presenza di una mutazione germinale non induca inesorabilmente l'insorgenza di melanoma.

Dall'analisi genomica di famiglie affette da melanoma familiare si è chiaramente evidenziato che membri della stessa famiglia, carriers di mutazioni germinali di geni ad alto rischio, residenti in aree geografiche diverse o comunque, esposti a "fattori esterni differenti", non sviluppavano tutti un melanoma; in queste famiglie, i carriers residenti nella stessa area geografica sviluppavano melanoma, mentre i componenti della famiglia, sempre carriers della stessa mutazione, ma emigrati in altre nazioni, non sviluppavano melanoma.

Questo conferma l'ipotesi della stretta sinergia "predisposizione genetica-fattori di rischio ambientali".

Per il melanoma familiare si può infatti parlare di “ereditarietà multifattoriale a soglia” , ovvero la predisposizione genetica e i fattori di rischio ambientali concorrono insieme a determinare il fenotipo patologico e, verosimilmente, la gravità della malattia. E questo è particolarmente vero per quelle mutazioni definite “a media e bassa penetranza”.

Alcune mutazioni germinali infatti, più di altre, conferiscono suscettibilità all’insorgenza del melanoma; ovvero affinché si manifesti il fenotipo patologico è necessario che uno o più geni sfavorevoli insieme ad uno o più fattori ambientali sfavorevoli, sommino il loro effetto patologico fino al raggiungimento di una soglia oltre la quale si manifesta la malattia.

Le cellule di un tumore contengono di regola numerose mutazioni, ma solo una minoranza sono **mutazioni driver**, ovvero quelle mutazioni genetiche fondamentali per la genesi e lo sviluppo del cancro. Tutte le altre mutazioni, cioè quelle che si ritiene non abbiano un significato fondamentale nello sviluppo del cancro vengono chiamate passenger mutations, ovvero mutazioni di passaggio. (Neil F et al, 2001)

I geni coinvolti nella predisposizione genetica al melanoma identificati fino ad oggi, vengono suddivisi in **geni ad alta penetranza, geni a media penetranza e geni a bassa penetranza**

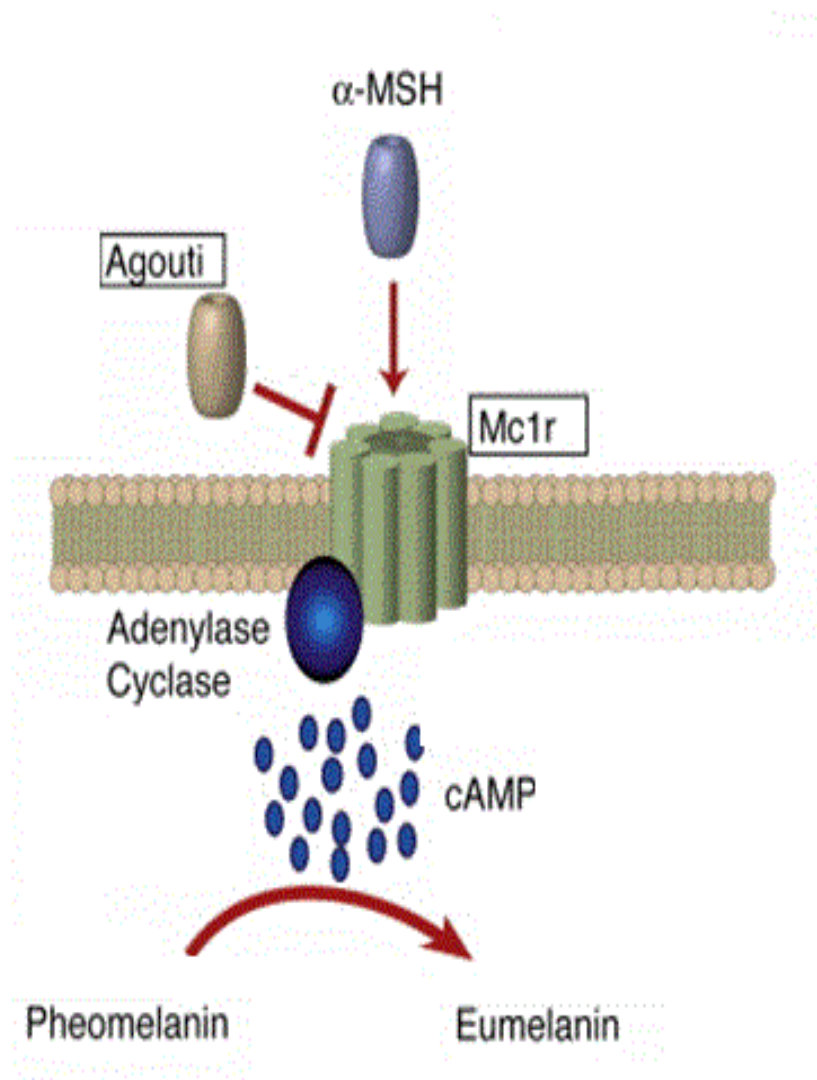
conferire un alto rischio, un medio rischio o un basso rischio per lo sviluppo della patologia negli individui portatori dei geni mutati.

Geni di suscettibilità

Ad alta penetranza	CDKN2A; CDK4
A media penetranza	MC1R; MTTF
A bassa penetranza	MTAP; EGF; GSTs; GST M1; GST T1; CYP2D6; VDR (vit.D receptor); TYR; ASIP; TYRP1; OCA2 (oculo-cutaneous-albinism) POT1;

I geni ad **alta penetranza** sono quelli che conferiscono al soggetto portatore un alto rischio di sviluppare il melanoma e sono il CDKN2A e CDK4 (che verranno descritti in maniera più approfondita dopo).

Tra i geni a **media penetranza** il più noto è il **MC1R**, ovvero il gene che codifica per il recettore della melanocortina.



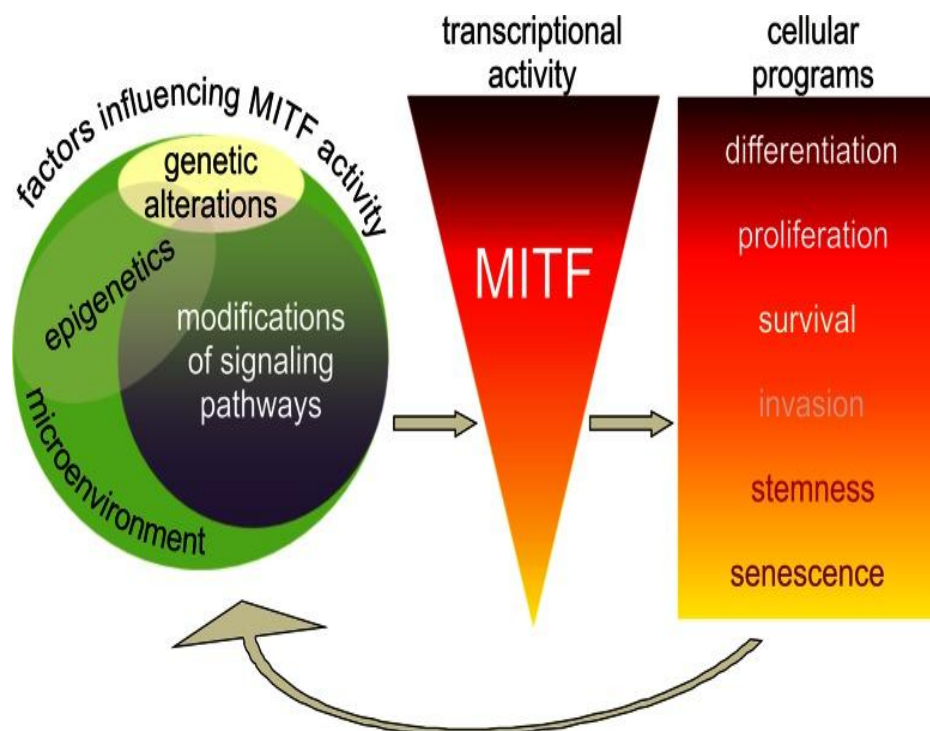
Il gene **MC1R** è localizzato sul cromosoma 16q24.3 e codifica per il recettore dell'ormone stimolante i melanociti (MC1R), un recettore di 317 aminoacidi, che trasduce il segnale con un meccanismo accoppiato alla proteina G. Il recettore si esprime in diversi tipi cellulari, inclusi melanociti e cheratinociti follicolari ed ha un ruolo chiave nella regolazione della pigmentazione cutanea. La pigmentazione cutanea è determinata dalla quantità di melanina sintetizzata dai melanociti epidermici, ed è riconosciuta come un meccanismo di protezione cutanea contro i danni al DNA indotti dall'esposizione solare.

La melanina è sintetizzata nei melanosomi che sono all'interno dei melanociti. Ci sono due forme di melanina epidermica, eumelanina (che ha colore nero - marrone) e feomelanina (colore rosso - giallo). Il legame tra MC1R ed il suo ligando, l'ormone α -stimolante i melanociti (α MSH), attiva le cicliasi e produce un aumento del livello di cAMP. ([Sturm, 2002](#)). L'elevata concentrazione di cAMP porta all'attivazione della proteina chinasi A, che a sua volta induce un aumento della trascrizione del gene MITF (microphthalmia-associated transcription factor) coinvolto nella trasformazione di feomelanina in eumelanina.

Il gene MC1R è altamente polimorfico e alcune sue varianti, usualmente associate a fototipi chiaro-rosso, raggruppate sotto la sigla RHC (Red Hair Color), determinano una minore produzione di eumelanina (rispetto alla feomelanina) dopo esposizione ai raggi UV. I melanociti che esprimono una variante MC1R di tipo RHC mostrano una maggiore sensibilità all'effetto citotossico delle radiazioni UV. La combinazione tra la presenza di tali varianti e l'esposizione intermittente ai raggi ultravioletti solari, è considerata responsabile dell'attivazione oncogenica di BRAF, attraverso un aumento indotto dei livelli intracellulari di AMP ciclico. Queste varianti quindi, determinando una minore fotoprotezione cutanea, sono associate ad un elevato rischio di tumori cutanei. Le varianti del MC1R conferiscono un rischio di melanoma molto più basso rispetto al CDKN2A, ma sono comuni nelle popolazioni europee. Le varianti RHC sono associate ad un maggior rischio di sviluppare melanoma negli individui portatori (O.R. 2,4) ([Jhappan et al., 2003](#)) ([Demenais et al., 2010](#)).

Studi recenti hanno dimostrato che la presenza di una variante MC1R in aggiunta a una mutazione CDKN2A aumenta significativamente il rischio di melanoma anticipando di almeno 20 anni l'insorgenza della malattia, rispetto agli individui con una mutazione CDKN2A sola. ([Box et al., 2001](#)).

Meno noto rispetto al precedente, ma oggi al centro delle ricerche oncologiche, è il gene **MITF** (fattore di trascrizione associato a Microftalmia) codificante per un regolatore di differenziazione, proliferazione, migrazione e senescenza dei melanociti. Il gene MITF è situato sul braccio corto del cromosoma 13 (Hartman et al., 2015; [Garraway et al., 2005](#); [Ugurel et al., 2007](#)



Alterazioni genetiche, epigenetiche o del microambiente influenzano l'espressione del MITF e la sua attività nelle cellule di Melanoma, intervenendo di conseguenza sui programmi di differenziazione (Bertolotto et al., 1998), proliferazione (Carreira et al., 2005), e senescenza cellulare. (Cheli et al., 2010). MITF in grado di controllare l'espressione di diversi geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare (HIF-1, BCL-2, MET, APE-1) (Beuret et al., 2007; Busca et al., 2005; Liu et al., 2009), il rimodellamento del citoscheletro e la migrazione (Carreira et al., 2006), e la proliferazione cellulare (CDK2) (Du et al., 2004). Inoltre, l'attività MITF è correlata alla resistenza all'apoptosi indotta da UV in melanociti.

Solo molto recentemente il gene MITF è stato identificato come nuovo gene di suscettibilità al melanoma. La mutazione germinale a carico del MITF conferisce suscettibilità allo sviluppo del melanoma nei soggetti carrier. Recentemente, il sequenziamento dell'intero genoma in probandi di famiglie affette da melanoma, che non presentavano mutazioni dei geni CDKN2A e CDK4, ha consentito di identificare una nuova variante (E318K) di suscettibilità al melanoma a penetranza intermedia nel gene che codifica per il Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF). Due studi caso-controllo, condotti nell'ambito di un'ampia popolazione australiana ed inglese, hanno inoltre confermato l'associazione della variante E318K con un aumentato rischio di sviluppare melanoma anche nella popolazione generale. (Bertolotto et al, 2011;.. Yokoyama et al, 2011; Xu et al., 2000).).

Questi risultati enfatizzano il ruolo dei meccanismi molecolari che regolano la pigmentazione cellulare nell'insorgenza di melanomi ed nella tumorigenesi in generale attraverso complesse interazioni genetico-ambientali.

Geni a bassa penetranza

Numerosi sono oggi gli studi finalizzati ad evidenziare mutazioni a carico di geni a bassa penetranza, che da soli non sono in grado di indurre l'insorgenza di melanoma ([Barrett et al., 2015](#)). Per questi geni si parla, più che per gli altri, di ereditarietà multi fattoriale a soglia. Fattori esterni, o altre mutazioni geniche minori, concorrono nel determinare il fenotipo patologico. Mutazioni a carico di geni a bassa penetranza sono molto più rappresentate nella popolazione generale. Quelli attualmente più studiati sono i geni coinvolti nella regolazione della pigmentazione.

Il gene **ASIP**, ad esempio, codifica per una proteina antagonista dell'alfa-MSH.

Il gene **OCA** codifica per una proteina di membrana coinvolta nel trasporto della tirosina, precursore della melanina.

Numerosi ricercatori oggi stanno focalizzando l'attenzione sui polimorfismi del gene che codifica per il recettore della vitamina D (**VDR**), che sembra giochi un ruolo importante nella melanomagenesi. (Orlow et al. 2012) .

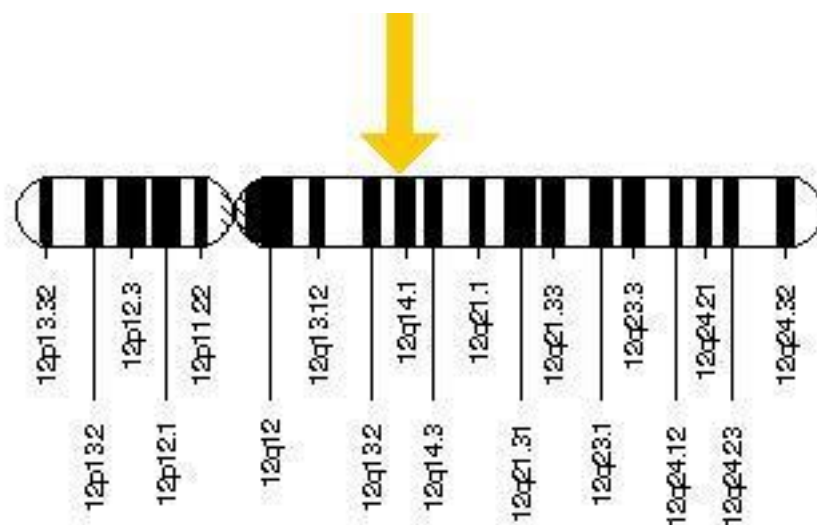
Uno dei geni più studiati recentemente è il **POT1**. Questo gene (di cui in realtà si sa poco e ancora non si sa dire se a bassa penetranza oppure no) codifica per una proteina nucleare coinvolta nella protezione dei telomeri, regolandone la lunghezza e . Protegge le e da alterazioni strutturali che potrebbero produrre effetti catastrofici per la cellula. Tramite la *next-generation sequencing* sono state identificate tre diverse mutazioni a carico del gene POT1 in una coorte di pazienti italiani con melanoma familiare e due diverse mutazioni in pazienti francesi e americani (Janxin et al, 2014).

Tanti altri geni sono oggi oggetto di studio e in un prossimo futuro potranno spiegare l'insorgenza di melanoma in alcuni cluster familiari. (Kosiniak-Kamysz and Agnieszka et al 2014)

CDK4

Il gene **CDK4** è un oncogene, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 12, in posizione 14, e codifica per una chinasi ciclina-dipendente essenziale nel passaggio della cellula dalla fase G1 alla S del ciclo cellulare.

Il gene è costituito da otto esoni di cui il primo esone non è codificante. Il codone di inizio si trova all'inizio dell'esone 2 e il codone di stop all'inizio dell'esone 8.



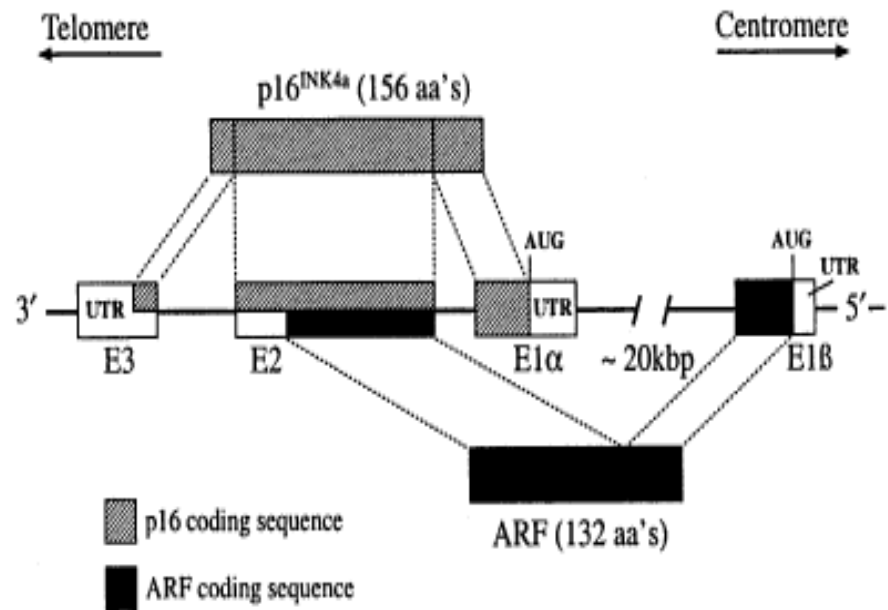
Le mutazioni più frequenti sono a livello dell'esone 2, nel codone 24 con sostituzione di arginina con cisteina (Arg24Cys), o arginina con istidina (Arg24His).

La bassissima frequenza di mutazioni per il CDK4 nel melanoma familiare, suggerisce che questo gene sia una causa rara di ereditarietà del melanoma e in alcuni centri non viene neanche più screenato. ([Zuo et al., 1996](#), [Rane et al., 2002](#))

Il **CDKN2A** risulta invece il più comune gene ad alto rischio di melanoma identificato nei melanomi maligni familiari. Secondo dati nazionali e internazionali, mutazioni germinali a carico della regione codificante del gene *CDKN2A* sono identificabili in una frazione compresa tra il 20% e il 40% delle famiglie (europee) con due o più membri affetti da melanoma, ([Hashemi et al., 2000](#)), nel restante 60-80% non è ancora stata identificata una mutazione specifica; in una percentuale minima invece (1% circa) la mutazione è a carico di altri geni noti. Nel 20-40% delle forme familiari di melanoma è presente quindi una mutazione del **CDKN2A**.

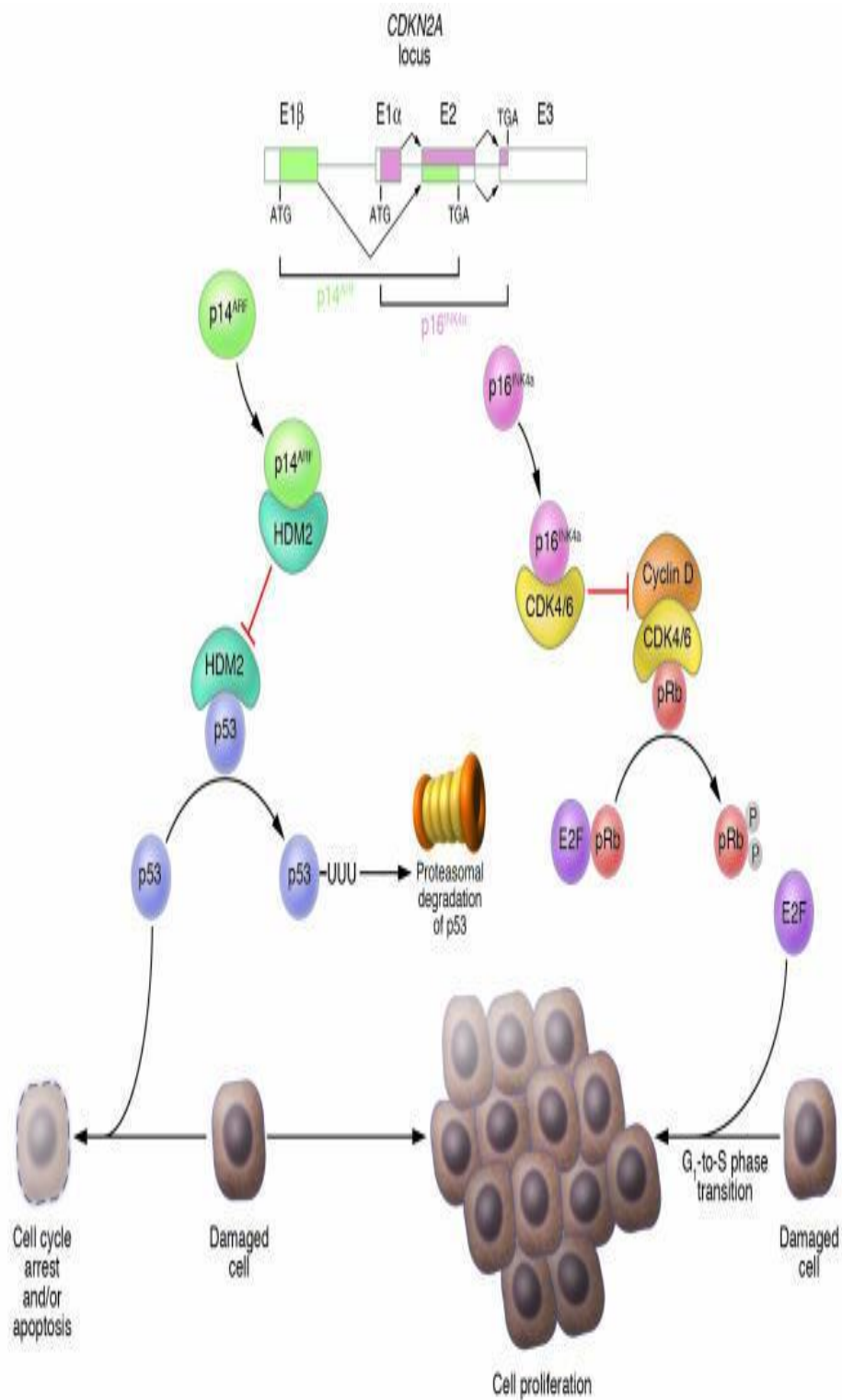
Nel 1994, per la prima volta, è stata identificata nelle famiglie con più soggetti affetti da melanoma, una mutazione del gene oncosoppressore **CDKN2A** localizzato nel locus 9p21 (braccio corto del cromosoma 9).

Il gene **CDKN2A** codifica per due distinte proteine, la proteina p16-ink4A (trascritto alfa da esoni E1 α , 2 e 3) e p14 ARF (trascritto di uno splicing alternativo dall'esone 1beta (E1 β , 2 e 3), che agiscono da soppressori tumorali, intervenendo con due diversi pathways sul controllo del ciclo cellulare.



La p16, viene codificata dal trascritto che comprende gli esoni 1α, 2 e 3, legando le chinasi ciclino-dipendenti 4 e 6 (CDK) e inibendo quindi la fosforilazione della proteina del retino blastoma (Rb), inibisce il passaggio della cellula dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Mutazioni del gene CDKN2A possono inattivare la sua funzione inibitoria e quindi permettere alle cellule di sfuggire al blocco in fase G1 e favorire una crescita incontrollata.



La p14-ARF (Alternative Reading Frame), sintetizzata mediante uno splicing alternativo dell'esone 1 β con gli esoni 2 e 3, media l'arresto cellulare in fase G1 e G2. Interagisce infatti con le proteine *Murine Double Minute 2* (MDM2) che legano la p53, ne prevengono la degradazione, determinando un incremento dei livelli intracellulari di p53. La p53 in risposta ad un danno genotossico induce l'apoptosi della cellula.

La disattivazione di p14 in seguito a mutazioni del gene CDKN2A porta all'accumulo di elevati livelli di MDM2 e quindi la perdita di funzione di p53 con conseguente attivazione dei processi di divisione cellulare. ([Laud et al., 2006](#); [Pavletich, 1999](#))

Le mutazioni del gene CDKN2A alterano le due principali vie di regolazione del ciclo cellulare attraverso i pathways del RB e della P53. ([Chin et al., 2006](#); [Kamb et al., 1994](#))

La maggior parte delle mutazioni di CDKN2A sono di tipo missense e si verificano in negli esoni 1α e 2, influenzando così prevalentemente la proteina p16. ([Begg et al., 2005](#); [Hayward, 2003](#)). In una piccola percentuale di casi sono state individuate mutazioni anche in alcune regioni non codificanti del gene, come nella untranslated region al 5' (5' UTR), nella regione 3'UTR e nei due introni che influenzano traslazione, l'iniziazione e lo splicing. ([Balogh et al., 2012](#); [Diursby et al., 2014](#); [Harland et al., 2001](#); [Veinalde et al., 2013](#)).

Le mutazioni di CDKN2A che si verificano a livello dell'esone 2 sono condivise dalle proteine p14ARF e p16INK4A, influenzano quindi, nella maggior parte dei casi, la funzionalità di entrambe le proteine. La maggior parte di mutazioni di tipo missense sono identificate a livello dell'esone 1α e dell'esone 2; mentre un ruolo specifico per la proteina p14ARF, nella predisposizione al melanoma, è stata confermata da diversi studi che hanno valutato solo l'influenza di mutazioni che interessano esclusivamente la p14ARF in un piccolo sottoinsieme di melanoma familiare. ([Garcia-Casado et al., 2009](#); [Harland et al., 2005](#); [Hewitt et al., 2002](#)). La frequenza di mutazioni nel gene CDKN2A varia a seconda delle popolazioni, in corrispondenza delle diverse aree geografiche: in generale la frequenza è più bassa nelle zone con clima soleggiato, e comunque va dal 20% in Australia, al 45% in Nord America fino al 57% in Europa.

Mediante analisi di segregazione è stato riscontrato **un modello di trasmissione della suscettibilità al melanoma di tipo Autosomico**

Dominante (AD), a penetranza incompleta ed espressività variabile. Il gene CDKN2A è un oncosoppressore, per tanto, affinché si sviluppi un melanoma, è necessaria l'inattivazione di entrambi gli alleli (Two-hit Hypothesis secondo Knudson, 1971).

Nel caso del melanoma familiare una prima mutazione quindi è di tipo germinale, ovvero ereditata da uno dei due genitori, la seconda è di tipo somatico e, generalmente, è una delezione, che porta alla cosiddetta "perdita dell'eterozigosi" (LOH). Questo meccanismo di trasmissione spiega il motivo per cui alcuni membri della famiglia, magari residenti in aree geografiche diverse, pur avendo un elevato rischio di sviluppare un melanoma, di fatto non lo sviluppano.

Sono state identificate **57 differenti mutazioni** sulla linea germinale di CDKN2A nelle famiglie affette da melanoma.

65% erano mutazioni missense,

16% delezioni,

7% inserzioni/duplicazioni,

10% mutazioni non-sense o dello splicing.

La maggioranza delle mutazioni di *cdkn2a* sono "founder mutations", come la G101W, cioè originata, verosimilmente, da un antenato comune alle diverse famiglie.

La mutazione del gene è stata associata anche all'insorgenza del Carcinoma del pancreas (sindrome Melanoma Carcinoma del pancreas, M-PC). (Lynch et al., 2002).

Il gene CDKN2A, al momento, è il gene clinicamente più importante per diagnosticare una predisposizione al melanoma. Il test di screening per mutazioni del gene può essere effettuato nei soggetti ad alto rischio.

Lechman ha evidenziato una notevole variabilità del tasso di mutazione in relazione all'etnia e alla posizione geografica. **La frequenza della**

mutazione sembra infatti essere più bassa nelle zone con clima soleggiato e nelle aree geografiche ad alta incidenza globale di melanoma. Anche la penetranza della mutazione, e quindi il rischio reale di sviluppare il melanoma nei soggetti carrier della mutazione, sembra essere differente in relazione all'area geografica di appartenenza; ad esempio nei soggetti di 80 anni di età la penetranza è risultata 58% in Europa, 76% negli Stati Uniti e 91% in Australia, dimostrando che la penetranza varia insieme ai tassi d'incidenza del melanoma tra le diverse popolazioni

Come detto in precedenza, si stima che l'incidenza della mutazione sia del 20% in Australia, area geografica a basse latitudine e ad alta incidenza globale di melanoma, del 45% nel Nord America e del 57% nei paesi Europei. Questi dati hanno portato ad adottare **differenti criteri di selezione per l'invio alla consulenza genetica** dei pazienti con sospetto melanoma familiare provenienti dalle diverse aree geografiche. (Bishop et al. 2007).

In Italia è possibile una consulenza genetica oncologica per sospetto melanoma familiare in presenza di una storia personale o familiare del paziente che rientri potenzialmente in uno o più dei seguenti criteri (indicati dalla SIGU, società italiana di genetica umana):

- 1) 2 o più casi di melanoma nello stesso ramo della famiglia;
- 2) mutazione nota in un gene predisponente (CDKN2A, CDK4);
- 3) melanoma multiplo;
- 4) sindrome del nevo displastico (o nevo atipico) e melanoma (nel paziente con DNS o nei familiari
- 5) melanoma insorto in giovane età e parente di primo grado con Carcinoma del Pancreas.

In paesi ad alta incidenza globale di melanoma i criteri sono più restrittivi e prevedono la presenza di almeno 3 soggetti, parenti di primo grado, affetti da melanoma.

Il rischio di sviluppare un melanoma , nel corso della vita, nella popolazione italiana generale è stimato dello 0,5%, contro il 2% degli USA, il 3,3 % dell’Australia e il 5,7% della Nuova Zelanda.

Per la bassa incidenza globale di melanoma della nostra area geografica è più probabile pensare che due parenti di primo grado con melanoma abbiano ereditato una mutazione genetica piuttosto che pensare che siano due casi di melanomi sporadici (da cui i criteri meno restrittivi rispetto ad Australia e Nuova Zelanda). La frequenza di mutazione è comunque correlata principalmente al numero di membri della famiglia affetti da melanoma, variando dal 25% delle famiglie con 2 soggetti con melanoma al 72% di quelle con 4 o più membri affetti . (Maubec E. et al. 2012)

L’insorgenza in giovane età, in assenza di una storia familiare non sembra, invece, essere un forte indicatore di mutazioni in CDKN2A, infatti diversi studi hanno dimostrato una bassa prevalenza di queste mutazione in pazienti con un esordio precoce di melanoma.

L’associazione tra carcinoma pancreatico e mutazioni del CDKN2A è stata proposta come una nuova sindrome ereditabile di cancro ("Familial Atypical Multiple Mole Melanoma-Pancreatic Cancer), dato che queste due forme maligne sono spesso osservate contemporaneamente nei pazienti.(LYNCH 2002).

Perché è importante identificare i melanomi familiari e i carriers delle mutazioni ad alta penetranza?

Studi internazionali hanno evidenziato che i carriers della mutazione CDKN2A appartenenti a famiglie con melanoma hanno un rischio relativo di sviluppare un melanoma nel corso della propria vita (da 0 a 80 anni) che va dal 58% (in Europa) fino al 91% . I Mentre nelle forme sporadiche di Melanoma il rischio di avere un melanoma aumenta con l'aumentare dell'età, nelle forme familiari minore è l'età del paziente con melanoma in una famiglia, maggiore è il rischio relativo di sviluppare la stessa malattia nei parenti giovani; più giovane infatti è il paziente con melanoma in una famiglia (early onset), più alto è il rischio relativo di sviluppare un melanoma nei giovani parenti.

L'identificazione di una predisposizione familiare a sviluppare il melanoma cutaneo, attraverso un test genetico, potrebbe essere di grande aiuto nella prevenzione primaria (rimozione fattori rischio ambientali/esogeni) e secondaria del melanoma (diagnosi precoce) (Fallah et al. 2014).

Lo studio genetico inoltre potrebbe, in un futuro non troppo lontano, guidare nella elaborazione di strategie terapeutiche mirate (target therapy) che si avvalgono di farmaci specifici che elettivamente agiscono sui pathways molecolari alterati dalla mutazione genetica identificata (da Hariharan, Vidhya, "Chemoprevention of Familial Melanoma" (2011). *Dissertations (6 month embargo)*. Paper 1. http://ecommons.luc.edu/luc_diss_6mos).

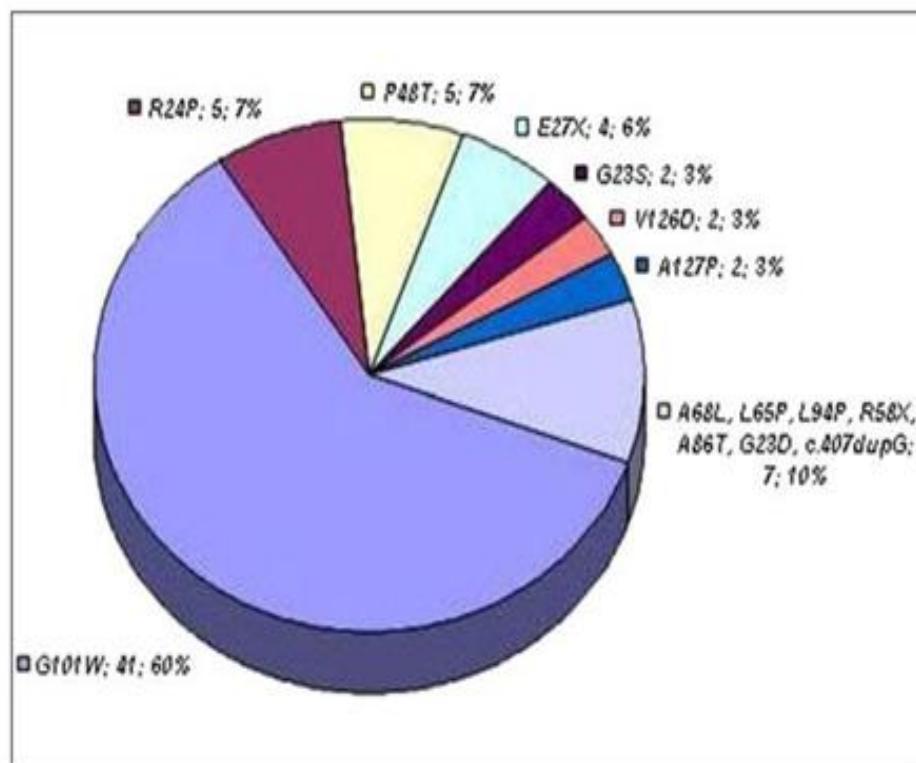
Dal momento che la diagnosi precoce del melanoma rappresenta la migliore possibilità di cura al momento attuale, gli obiettivi principali dello screening e del counseling genetico sono:

- caratterizzare il profilo genetico che conferisce la predisposizione al melanoma,

- identificare gli individui ad alto rischio che possono essere inseriti in percorsi di follow-up, di controllo periodico dermato-oncologico
- indicare comportamenti idonei che non esponano a fattori di rischio addizionali che possono aumentare la penetranza della mutazione (scottature solari e lettini abbronzanti etc)

Dati relativi all' Italia

Un recente lavoro (Bruno et al.2009) riassume i risultati di studi di citogenetica su 208 famiglie con melanoma familiare (che rispondono ai criteri SIGU, precedentemente illustrati) delle seguenti regioni italiane: Piemonte, Liguria, Lombardia, Emilia Romagna, Lazio, Campania, Toscana e Puglia; lo screening genetico ha evidenziato che le mutazioni del gene del CDKN2A sono presenti nel 33% delle famiglie (68 famiglie) e che almeno 14 differenti tipi di mutazione di questo gene sono state evidenziate; di queste, la **G101W ne rappresenta il 60%** circa. Questa è una mutazione missense, definita "founder effect" che è molto rappresentata anche in famiglie francesi e americane. L'analisi dell'aplotipo ha suggerito che tali genotipi derivino da un singolo aplotipo ancestrale in cui per primo si è verificato la mutazione (founder), ed è probabile che questa mutazione abbia avuto luogo nell'Europa sud-occidentale. Altre mutazioni frequenti sono: E27X, G23S, R24P, P48T.



Nessuna famiglia, come ci si aspettava, presentava alterazioni a carico della sequenza del CDK4.

Dati analoghi sulla nostra regione non esistono o sono parziali. Uno degli obiettivi di questo progetto è stato quello di identificare e sottoporre a test genetico le famiglie con Melanoma Familiare (MF) della nostra area geografica, identificare la percentuale di carrier della mutazione del gene CDKN2A in Sicilia, il tipo di mutazione presente e valutare il ruolo di altri fattori di rischio nel determinismo della neoplasia. È plausibile infatti che i risultati del test genico non siano perfettamente sovrapponibili a quelli del resto di Italia ed è verosimile che la Sicilia occidentale presenti mutazioni differenti rispetto alla Sicilia orientale, proprio per il background storico differente.

Materiali E Metodi

Una analisi retrospettiva dei dati clinici relativi a 450 pazienti con melanoma trattati presso il dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche dell'Università di Palermo, nel periodo compreso dal gennaio 2009 all'agosto 2015, ha evidenziato che cinquantasei pazienti presentavano un melanoma familiare, ovvero rispondevano ai criteri della Società Italiana di Genetica Umana per la diagnosi clinica di melanoma familiare e per tale motivo sono stati sottoposti allo screening genetico della mutazione del geni ad alta penetranza CDKN2A e CDK4.

Dai dati clinici e anamnestici ricavati dalle cartelle cliniche, da colloqui mirati e dai referti istocitopatologici relativi al tumore è stato possibile:

- l'elaborazione di un albero genealogico
- L'identificazione di altre patologie neoplastiche (personali o familiari) associate
- l'identificazione, in alcuni casi, di fattori esterni-ambientali che hanno potenzialmente indotto la perdita dell'eterozigosi (LOH) e quindi favorito l'insorgenza del melanoma nell'ambito di una famiglia.
- La valutazione dell'età media alla diagnosi
- Stima delle varianti istologiche più frequenti
- Valutazione dello stadio della malattia (e quindi della prognosi) al momento della diagnosi

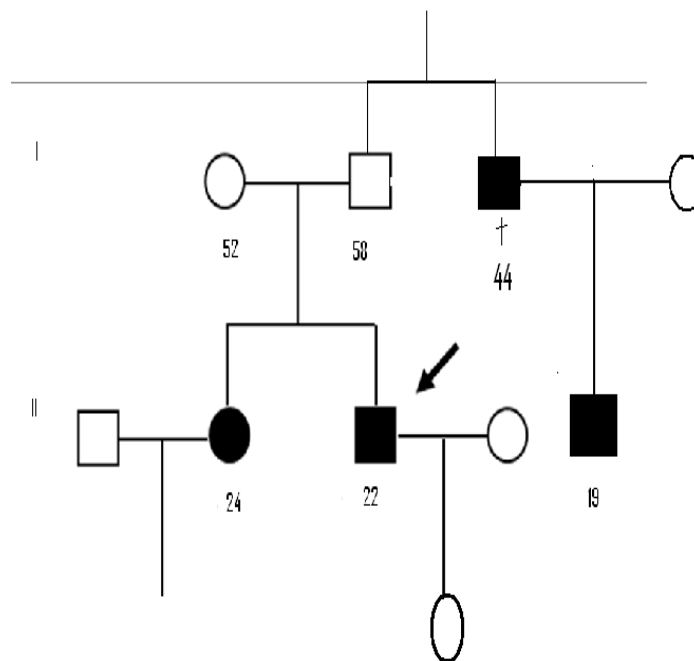
A 56 pazienti con melanoma che presentavano i requisiti per la diagnosi di Melanoma familiare è stato proposto di iniziare un percorso di consulenza genetica oncologica specifica, atta a valutare il rischio genetico di malattia

e la presenza di una mutazione specifica a carico di uno dei due geni ad alta penetranza CDKN2A e CDK4.

La **consulenza genetica**, effettuata con l'oncogenetista, ha previsto tre incontri col paziente.

Al primo incontro:

- si è elaborato l'albero genealogico del paziente esteso per tre generazioni ai parenti di secondo grado del probando.



Esempio di 3 cugini che all'età di 24, 22 e 19 anni hanno sviluppato un melanoma, con test genetico negativo. All'anamnesi si evince che il padre di uno dei 3 pazienti era deceduto all'età di 44 anni per melanoma.

- Si sono evidenziati dati anagrafici, patologie oncologiche associate ed età di insorgenza di qualunque tumore (documentato) quindi le cause di morte.

- Si è valutata la anamnesi del paziente con particolare attenzione a fattori di rischio specifici per melanoma, personali (presenza di numerosi nevi o di nevi atipici) e ambientali (esposizione professionali o ustioni da sole in età prepuberale, uso di lettini abbronzanti etc).

- Si è stimato il rischio di malattia e si è spiegato al probando obiettivi, potenzialità e limiti del test genetico (consenso informato al test). Ad ogni paziente, e questo è molto importante, è stato spiegato che un test negativo (cioè che non evidenzia mutazioni a carico dei geni screenati), non esclude la presenza di una mutazione genetica differente, non screenata (di altri geni) e che, se il test dovesse essere positivo sarà possibile estendere lo screening ai familiari.

Al secondo incontro, dopo avere dato il proprio consenso formale all'esecuzione del test, si effettua un prelievo ematico al paziente. Dal sangue periferico si estrae il DNA per il test genetico.

L'intera sequenza codificante del *CDKN2A* (esoni 1alfa, 1 beta, 2 e 3), le giunzioni esone-introne, e la regione 5'UTR vengono analizzate.

Nel gene *CDK4* viene analizzato l'esone 2, nel quale sono localizzate le poche mutazioni ricorrenti finora riscontrate.

Al terzo incontro viene consegnato il risultato del test. Qualunque sia il risultato del test al probando viene indicata il rischio genetico connesso alla presenza di una mutazione (nel caso di test positivo) e, in caso di test negativo, il rischio correlato comunque alla familiarità per melanoma. Ai probandi vengono spiegate strategie di prevenzione (eliminazione fattori di rischio comportamentali etc) e indicato il percorso di prevenzione-diagnosi e cura più adatto. Quindi viene fornita una assistenza psicologica.

Tutti i pazienti hanno accettato di sottoporsi allo screening genetico; il risultato di 6 dei 56 test effettuati non è ancora pronto, pertanto l'elaborazione dei risultati viene effettuata su 50 pazienti e non terrà conto di questi sei pazienti.

Analisi di sequenziamento

Lo screening della mutazione germinale dei geni CDKN2A e CDK4 è stata effettuata sul DNA estratto da sangue intero periferico di pazienti con melanoma familiare utilizzando il QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germania).

Allo spettrofotometro tutti i campioni di DNA erano di qualità sufficiente per essere genotipizzati. Il sequenziamento diretto dei prodotti di PCR dei quattro esoni (1alfa, 1beta, 2, 3) del gene CDKN2A e dell'esone 2 del gene CDK4 è stato eseguito utilizzando un v3.1 BigDye Terminator e poi ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems , Foster City, CA). L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando i softwares "Sequencing Analysis 5.1.1" e il "Run 3100 Data Collection v2.0".

Risultati

Dalla revisione degli alberi genealogici, dei dati clinici (età alla diagnosi, fenotipo cutaneo, presenza di altri tumori etc), dei referti istologici e dei risultati dei test genetici, abbiamo ricavato dati molto interessanti.

Numero pazienti		50	
Sesso		Maschi	25
		Femmine	25
Sede anatomica del melanoma	Testa-collo	2	
	Tronco	30	
	arti	18	
Istotipo	Mel in situ	11	
	SSM	26	
	Mel Nodulare	13	
Un solo Melanoma		40	
Melanomi multipli:		10	
Sincroni		3	
Metacroni		7 di cui	
		6 Mel in situ	
		5 Mel < 1mm	
		1 Mel >1 mm	

Spessore sec Breslow del melanoma primario		
Melanoma in situ		11
Mel < 1mm		20
Mel tra 1 e 2 mm		9
Mel > 2mm		10
Stadio sec AJCC	0	11
	Ia	14
	Ib	14
	IIa	3
	IIb	4
	III	3
	IV	1
Età alla diagnosi		
	<20	5
	20-30	8
	30-40	20
	40-50	10
	>50	7

Familiarità	
- < 2	45
- >2	5
Altre neoplasie (del probando)	4
Leucemia mieloide cronica	1
Carcinoma mammario	3 (BRCA 2 pos)
Screening per mutazioni di CDKN2A	1
Screening per mutazioni del CDK4	0

Alcuni dei nostri risultati sono sovrapponibili con quanto riportato in letteratura, altri no. L'incidenza del melanoma familiare nella nostra casistica è del 11,11% , dato coerente con la percentuale riportata in letteratura (10-12%).

Tutti i pazienti presentano un fototipo chiaro, tipo I-III di Fitzpatrick e 4 pazienti avevano capelli rossi.

All'anamnesi personale quasi tutti i pazienti presentavano una storia di esposizione solare ricreativa non protetta (spiaggia) o addirittura di ustioni solari in adolescenza. L'attività lavorativa non sembra aver rappresentato un fattore di rischio (pochi e non significativi casi di lavoratori rurali o pescatori).

In nessun caso è stata evidenziata una esposizione professionale-ambientale a fattori di rischio.

Nella nostra casistica il melanoma familiare colpisce in ugual misura donne e uomini. L'età media alla diagnosi è di 35,8 anni (con range 15 – 60aa) .

Nel 60% dei casi il melanoma insorge a livello del tronco. Nel 36% dei casi insorge a livello degli arti e nel 4% dei casi interessa il distretto testa-collo.

Il 52% dei melanomi è istologicamente un Superficial spreading Melanoma, mentre il 26% è un melanoma nodulare e 22% un melanoma in situ. Nessun caso di Lentigo Maligna Melanoma e melanoma acrale è stato osservato tra i pazienti che rispondevano ai criteri per il counseling genetico. Anche questi dati sono in parte sovrapponibili con quanto riportato in letteratura (Sargen M. et al , 2014).

Dieci dei pazienti in esame presentavano lesioni multiple; in 3 pazienti erano presenti più melanomi contemporaneamente al momento della diagnosi (melanomi sincroni) mentre in 7 casi una seconda (e una terza in un caso) lesione primaria è comparsa durante il periodo di follow up (melanomi metacroni). Quasi tutti i melanomi multipli istologicamente erano melanomi in situ o sottili intercettati precocemente durante le visite di controllo.

Un dato molto interessante è relativo allo stadio di malattia dei pazienti con melanoma familiare. La maggior parte dei nostri pazienti infatti, il 62%, presentava un melanoma sottile al momento della diagnosi (22% un melanoma in situ, 40 % melanoma con spessore secondo Breslow < 1mm); il 18% presentava un melanoma con spessore Breslow tra 1 e 2 mm e il 20% un melanoma di spessore >2mm. 18 melanomi (36%) presentavano ulcerazione all'esame istologico. Quattro pazienti risultano deceduti (8%).

La maggior parte dei pazienti, 78%, al momento della diagnosi erano in uno stadio O-I secondo AJCC staging system, il 14% era allo stadio II, mentre solo 4 pazienti (8%) erano in stadi avanzati di malattia(III-IV).

Questo dato si presta ad interpretazioni non univoche. Perché il melanoma familiare è prevalentemente un melanoma sottile?

È legittimo pensare che abbia un comportamento biologico diverso e più benevolo rispetto al melanoma sporadico e possa essere associato quindi ad una prognosi intuitivamente più favorevole? oppure, lo spessore sottile del melanoma alla diagnosi è il risultato di una buona prevenzione secondaria? O della maggiore attenzione nei confronti dei nevi da parte dei familiari di parenti affetti da melanoma (autoesame, visite dermatologiche)? Ad oggi non siamo in grado di rispondere con certezza a queste domande.

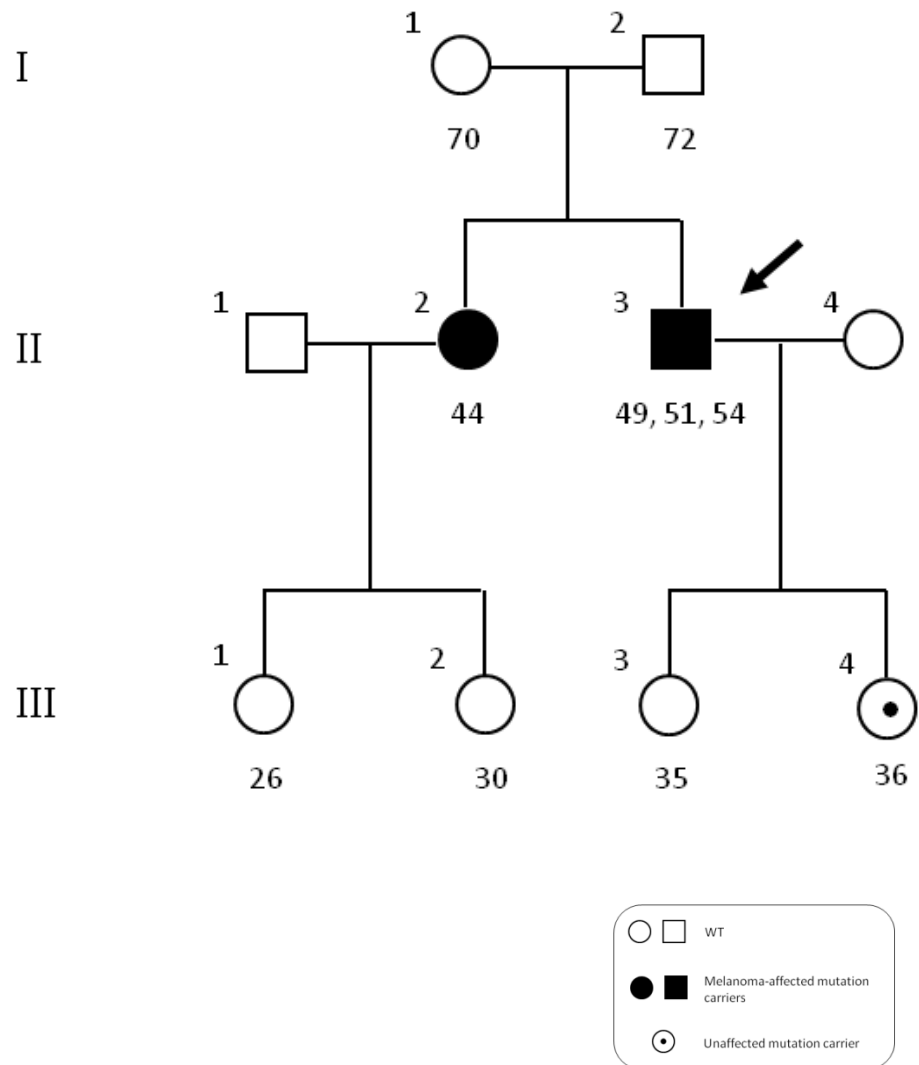
Una anamnesi patologica personale significativa è stata evidenziata solo in tre casi. Tre donne con melanoma familiare, negative al test genetico per CDKN2a e CDK4, avevano una anamnesi personale di carcinoma mammario BRCA1 Correlato. Questo dato occasionale trova riscontro in letteratura. Alcuni recenti reports infatti associano la mutazione BRCA all'insorgenza di altre neoplasie non mammarie tra cui il melanoma. Nello specifico viene riportato in letteratura una maggiore incidenza di melanoma rispetto alla popolazione generale nei breast cancer survival carrier della mutazioni dei geni BRCA1-2. Questo aspetto merita sicuramente un maggiore approfondimento e ulteriori studi (in corso).

Altro dato importante, coerente con la letteratura specialistica, è che il 70% dei pazienti ha tolto uno o più nevi displastici oltre al melanoma e presenta un numero elevato di nevi.

Ma il risultato sicuramente meno prevedibile è quello relativo allo screening delle mutazioni: uno solo dei cinquanta pazienti screenati (di cui è disponibile il risultato del test) è risultato carrier della mutazione a carico del gene CDKN2A. Nessun paziente, come invece ci si aspettava, è risultato portatore della mutazione CDK4.

Se l'incidenza della mutazione CDKN2A nei melanomi familiari della nostra area geografica è, come riportato nella letteratura nazionale e

internazionale, pari al 30% circa, il risultato atteso era di avere 15 pazienti carriers della mutazione, e non 1 solo.



Il probando positivo per la mutazione presentava un primo melanoma pT2aN0M0 e altri 3 melanomi primari, metacroni, sottili e in situ.

La positività del test del probando ha consentito di estendere lo screening ai familiari del probando e la stessa mutazione è stata identificata nella figlia (portatore sano) e nella sorella carrier della mutazione e affetta da melanoma.

La mutazione evidenziata è la **R87w**, a carico dell'esone 2 del gene CDKN2A. Non è una di quelle più frequenti evidenziate in Italia (G101W, 60%, R24P, 7%, P48T, 7%, E27X, 6%) dallo unico studio cooperativo pubblicato nel 2009 da Bruno et al., ma una mutazione insolita. Questo tipo di mutazione, che causa sostituzione di Arginina con Triptofano alla posizione 87, formalmente non è ancora stata associata al melanoma familiare ed in letteratura è stata descritta solo in due casi in Spagna e In Grecia .

Conclusioni

Il melanoma è la forma più grave e aggressiva di cancro della pelle la cui incidenza è in continuo aumento negli ultimi decenni. La prognosi dei pazienti con melanoma cutaneo è correlata allo stadio della malattia al momento della diagnosi. (Tsao et al., 2012); Il melanoma in uno stadio avanzato non risponde infatti alle terapie convenzionali (Bishop et al., 2007) per tanto le prognosi sono spesso infauste. La prevenzione primaria e secondaria (la diagnosi precoce) rappresentano le uniche strategie efficaci nella lotta al melanoma (Bhatia et al., 2014).

L'identificazione di soggetti a rischio di sviluppare una malattia spesso fatale è estremamente importante.

Sarebbe infatti possibile ridurre l'incidenza di malattia, mettendo in atto una vera prevenzione primaria, raccomandando ai soggetti a rischio, geneticamente suscettibili al melanoma, di limitare o evitare fattori di rischio esterni e comportamentali che possono aumentare la penetranza della mutazione genetica; consentirebbe inoltre di inserire i soggetti a rischio in programmi di controllo onco-dermatologico periodico che permetterebbero di intercettare la neoplasia precocemente in una fase iniziale, curabile e guaribile.

Le Mutazioni germinali del geni CDKN2A, coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, conferiscono un alto rischio di melanoma maligno nei soggetti carriers della mutazione (Della Torre et al., 2001). Oltre ai geni ad alta penetranza, che conferiscono un alto rischio di sviluppare il melanoma, sono stati identificate altre varianti alleliche o mutazioni a carico di geni minori, (MC1R, MITF, Asip etc) definiti come geni di suscettibilità a basso o medio rischio o come modificatori-amplificatori dei geni di suscettibilità ad alto rischio (Udayakumar et al., 2010).

Nella maggior parte delle casistiche riportate in letteratura l'elevato numero di casi di melanoma nella stessa famiglia, la precocità dell'insorgenza del melanoma (early age at onset) e la presenza di

melanomi multipli nello stesso paziente (sincroni o metacroni) sono fortemente correlati alla presenza e alla trasmissione ereditaria della mutazione del gene CDKN2A, che è presente nel 20-40% dei pazienti con melanoma familiare (Tsao et al., 2000). La penetranza della mutazione, ovvero la manifestazione del fenotipo neoplastico, nelle famiglie carriers della mutazione è del 30% entro i 50 anni di età, del 67% a 80 anni d'età, ma sembra fortemente variabile in relazione all'area geografica di appartenenza; il rischio sembra maggiore nei residenti di aree geografiche più soleggiate (Bishop et al., 2002; Fallah et al, 2014).

L'analisi dei nostri risultati indica che nel nostro campione regionale di Melanoma Familiare la mutazione del gene CDKN2A abbia una incidenza di molto inferiore ai dati riportati in letteratura e che nella maggior parte delle forme familiari si riscontrano melanomi sottili e in uno stadio precoce di malattia.

L'interpretazione di questi dati è tutt'altro che semplice e induce e solleva numerosi interrogativi, cui, per le conoscenze attuali, purtroppo temo non sia possibile dare risposta.

È legittimo infatti chiedersi se esiste una correlazione tra lo spessore sottile del melanoma familiare e la negatività allo screening delle mutazioni ad alta penetranza, o meglio, se lo spessore sottile del melanoma sia correlato a mutazioni geniche minori (non screenate e non note) che conferiscono al tumore un comportamento biologico meno aggressivo.

Come detto in precedenza la negatività al test chiaramente non esclude il carattere ereditario del melanoma.

Si può ipotizzare che il melanoma familiare nella nostra regione sia da attribuire a mutazioni genetiche, non screenate, di geni a media o bassa penetranza, che, insieme a fattori di rischio ambientali inducano l'insorgenza di Melanomi sottili, ovvero potenzialmente con comportamento biologico e quindi prognosi più favorevole?

Questa ipotesi è supportata anche dall'evidenza che solo 4 pazienti con melanoma familiare negativo per mutazioni di geni ad alta penetranza sono deceduti entro i 5 anni di follow-up (ed erano melanomi >1mm con ulcerazione alla diagnosi).

Come accennato all'inizio della tesi il melanoma è una patologia complessa ed eterogenea alla cui patogenesi concorrono più fattori genetici, individuali e ambientali.

Gli studi di citogenetica hanno evidenziato la spiccata eterogeneità molecolare del melanoma, identificando numerose mutazioni di geni in differenti pathways, coinvolti in misura differente nella melanomagenesi e verosimilmente responsabili del comportamento biologico più o meno aggressivo della neoplasia. Secondo l'ipotesi di un secondo modello di melanomagenesi (modello "non Lineare") alcune mutazioni specifiche, a carico di elementi cellulari staminali, darebbero direttamente origine a melanomi in crescita verticale o già metastatici senza passare attraverso la fase di melanoma in situ o a crescita orizzontale (SSM); per lo stesso principio una mutazione specifica potrebbe dare origine solamente a melanomi sottili o in situ.

Ma quali possono essere i geni coinvolti che dovremmo screenare?

Altro interrogativo è relativo al perché è così bassa l'incidenza di mutazione nel nostro campione regionale?

In letteratura si stima che la mutazione del gene CDKN2A, ad alta penetranza, nei melanomi familiari in aree geografiche a bassa incidenza di melanoma come l'Europa e il Nord America sia presente nel 30 e il 57% dei casi di melanoma familiare. In teoria quindi il risultato atteso era che almeno 14-15 pazienti presentassero la mutazione genetica indagata (stimando una incidenza minima del 30%) e che la metà di questi

portassero la mutazione G101W. (*Goldstein et al., 2007, Mantelli et al., 2002; Puig et al., 2005; Ciotti et al., 2000*)

Uno solo dei nostri pazienti presentava una mutazione genetica del CDKN2A, ma non la G101W, come riportato nelle maggior parte delle casistiche pubblicate, bensì la mutazione **R87w**, una rara mutazione missense nell'esone 2 che causa sostituzione di Arginina con Triptofano alla posizione 87, ad oggi non formalmente associato all'insorgenza di Melanoma Familiare.

A differenza di individui appartenenti ad altre regioni europee e italiane, le famiglie siciliane esaminate hanno mostrato una frequenza molto bassa della mutazione CDKN2A. Questa differenza può essere attribuita a diversi fattori quali, ad esempio, il background storico della Sicilia, culla di diverse popolazioni, culture e civiltà, e la sua posizione geografica cruciale nel centro del Mediterraneo. Studi sulle varianti alleliche della emoglobina nelle beta talassemie (Giambona et al., 2011) hanno dimostrato l'estrema eterogeneità genetica del popolo Siciliano, verosimilmente effetto delle dominazioni (Greci, Fenici, Etruschi, Romani, Bizantini, Arabi, Normanni, Aragona, borboni) che si sono succedute nella storia della nostra regione. Un recente studio Italiano (Casula et al 2007-2009) confrontando i risultati dello screening genetico del gene CDKN2A in melanomi familiari di altre regioni del bacino del mediterraneo (Sardegna e Campania), ha evidenziato dati interessanti che sembrano avvalorare la nostra ipotesi; sembra infatti che in Campania la frequenza della mutazione sia tendenzialmente più bassa rispetto a quella del Nord Italia, con percentuali di positività che si aggirano intorno al 17%, mentre nei melanomi familiari della Sardegna la frequenza della mutazione è praticamente nulla. Percentuali di mutazioni così basse sono state descritte solo nelle aree geografiche ad alta incidenza di Melanoma (come l'Australia) in cui la probabilità di riscontrare la mutazione del gene CDKN2A, ad alta penetranza, nell'ambito dei Melanomi Familiari è piuttosto bassa ed è stimata intorno al 20%. Verosimilmente in queste area geografiche ad alta incidenza globale di melanoma è probabile che le forme di Melanoma familiare siano dovute alla ereditarietà di geni a

media o bassa penetranza (come MTIF, MC1R ad esempio) e alla condivisione ambientale (esposizione solare etc) dei membri di una stessa famiglia, piuttosto che a mutazioni di geni ad alta penetranza. La regione Sicilia non è definita certamente “ad alta” incidenza di melanoma globale; in Italia infatti vi è un trend decrescente Nord-Sud con tassi di incidenza nel meridione di 4 volte inferiori rispetto al nord.

La latitudine e la conseguente maggiore esposizione al sole nella nostra regione (rispetto ad altre regioni di Italia o all’ Europa) rappresentano probabilmente i fattori ambientali che causando la perdita di eterozigosi (LOH) di geni di media o bassa suscettibilità, promuovono l’insorgenza del melanoma.

La nostra latitudine e la nostra storia potrebbero renderci geneticamente differenti rispetto alla popolazione europea.

I nostri risultati ci hanno portato a ipotizzare che la bassissima frequenza di mutazioni della linea germinale CDKN2A potrebbe essere una firma genetica specifica per la popolazione dei pazienti siciliani affetti da melanoma familiare ([*Di Lorenzo S., et al 2015*](#))

L’arruolamento di nuovi pazienti per i test genetici e l’introduzione di nuovi test per screenare mutazioni a carico di geni “minori” che conferiscono una moderata o bassa suscettibilità al melanoma familiare, aiuteranno a chiarire quali sono le mutazioni genetiche più comuni, il ruolo dei fattori ambientali nel determinismo di questa malattia e, non ultimo, il significato prognostico di queste mutazioni (melanomi sottili vs melanomi spessi).

La lotta al melanoma oggi è affidata alla diagnosi precoce. L’identificazione di soggetti a rischio e l’adozione di strategie di prevenzione primaria rappresentano l’unica arma disponibile per la guarigione del melanoma.

Presto la ricerca porterà maggiore chiarezza sui meccanismi molecolari

coinvolti nella melanomagenesi e sui meccanismi biologici che regolano lo sviluppo e la progressione della neoplasia. Sarà possibile classificare da un punto di vista molecolare ogni paziente con melanoma e indirizzare il paziente verso la terapia specifica per il proprio tipo di aberrazione genetico-molecolare.

Per quanto però il futuro della ricerca genetica sul melanoma non sia troppo lontano, e certi obiettivi sembra che potranno essere raggiunti a breve, oggi, anche noi, 190 anni dopo Thomas Fawcington (1826)... “ are hence forced to confess the incompetency of our knowledge of the disease under consideration, and to leave to future investigators the merit of revealing the laws which govern its origin and progress....and pointing out the means by which its ravages may be prevented or repressed”.

Bibliografia

- Balogh K, Szell M, Polyanka H, *et al.* (2012) Detection of a rare CDKN2A intronic mutation in a Hungarian melanoma-prone family and its role in splicing regulation. *Br J Dermatol* 167:131-3.
- Barrett JH, Taylor JC, Bright C, *et al.* (2015) Fine mapping of genetic susceptibility loci for melanoma reveals a mixture of single variant and multiple variant regions. *Int J Cancer* 136:1351-60.
- Bauer J, Buttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis NA, Landi MT, Scolyer RA, Bastian BC. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24:345-51
- Begg CB, Orlow I, Hummer AJ, *et al.* (2005) Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *J Natl Cancer Inst* 97:1507-15.
- Bennett DC (2008) How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 21:27-38.
- Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, *et al.* (1998) Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 142:827-35.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, *et al.* (2011) A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 480:94-8.
- Beuret L, Flori E, Denoyelle C, *et al.* (2007) Up-regulation of MET expression by alpha-melanocyte-stimulating hormone and MITF allows hepatocyte growth factor to protect melanocytes and melanoma cells from apoptosis. *J Biol Chem* 282:14140-7.

- Bhatia S, Emdad L, Das SK, *et al.* (2014) Non-BRAF targeted therapies for melanoma: protein kinase inhibitors in Phase II clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 23:489-500.
- Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, *et al.* (2002) Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 94:894-903.
- Bishop JN, Harland M, Randerson-Moor J, *et al.* (2007) Management of familial melanoma. *Lancet Oncol* 8:46-54.
- Danielle C. Bonadies MS, Allen E. Bale Hereditary Melanoma, *Curr Probl Cancer* 2011;35:162-172
- Box NF, Duffy DL, Chen W, *et al.* (2001) MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet* 69:765-73.
- Bruno W, Ghiorzo P, Battistuzzi L, *et al.* (2009) Clinical genetic testing for familial melanoma in Italy: a cooperative study. *J Am Acad Dermatol* 61:775-82.
- Busca R, Berra E, Gaggioli C, *et al.* (2005) Hypoxia-inducible factor 1{alpha} is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J Cell Biol* 170:49-59.
- Carreira S, Goodall J, Aksan I, *et al.* (2005) Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433:764-9.
- Carreira S, Goodall J, Denat L, *et al.* (2006) Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20:3426-39.
- Casula M, Colombino M, Satta MP, *et al.* (2007) Factors predicting the occurrence of germline mutations in candidate genes among patients with cutaneous malignant melanoma from South Italy. *Eur J Cancer* 43:137-43.

- Casula M, Muggiano A, Cossu A, *et al.* (2009) Role of key-regulator genes in melanoma susceptibility and pathogenesis among patients from South Italy. *BMC Cancer* 9:352.
- Cheli Y, Giuliano S, Botton T, *et al.* (2011) Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30:2307-18.
- Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, *et al.* (2010) Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res* 23:27-40.
- Chen Y, *et al* (2007) A prospective study of blood selenium levels and the risk of arsenic-related premalignant skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16 (2): 207-13, 2007.
- Chin L, Garraway LA, Fisher DE (2006) Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20:2149-82.
- Ciotti P, Struewing JP, Mantelli M, *et al.* (2000) A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families. *Am J Hum Genet* 67:311-9.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353:2135-47
- Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:4340-46
- Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T, *et al.* (2004) BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene* 23:5968-77.
- Della Torre G, Pasini B, Frigerio S, *et al.* (2001) CDKN2A and CDK4 mutation analysis in Italian melanoma-prone families: functional

characterization of a novel CDKN2A germ line mutation. *Br J Cancer* 85:836-44.

- Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, *et al.* (2010) Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *J Natl Cancer Inst* 102:1568-83.

- Di Lorenzo S, Fanale D. , Corradino B., *et l.* Absence of germline CDKN2A mutation in Sicilian Patients with Familial Malignant Melanoma: could it be a population-specific genetic signature? *Cancer Biology & Therapy*, DOI:10.1080/15384047.2015.1108494

- Djursby M, Wadt K, Lorentzen H, *et al.* (2014) [CDKN2A-mutation in a family with hereditary malignant melanoma.]. *Ugeskr Laeger* 176.

- Du J, Widlund HR, Horstmann MA, *et al.* (2004) Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* 6:565-76.

- Dubrow R (1986) Malignant melanoma in the printing industry. *Am J Ind Med* 10 (2): 119-26, 1986

- Fallah M, Pukkala E, Sundquist K, *et al.* (2014) Familial melanoma by histology and age: joint data from five Nordic countries. *Eur J Cancer* 50:1176-83.

- Fargnoli M. *et al.* (2010) "MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis" *European Journal of Cancer* 46 (2010) 1413-1420.

- Freedberg DE, Rigas SH, Russak J, *et al.* (2008) Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma. *J Natl Cancer Inst* 100:784-95.

- Fukunaga-Kalabis M, Roesch A, Herlyn M. From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1600-4

- Garcia-Casado Z, Nagore E, Fernandez-Serra A, *et al.* (2009) A germline mutation of p14/ARF in a melanoma kindred. *Melanoma Res* 19:335-7.

- Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, *et al.* (2005) Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436:117-22.
- Ghiorzo P. *et al.* " Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic Lesions from familial melanoma patients" *Human Pathology* vol 35 n.1 Jan 2004.
- Giambona A, Vinciguerra M, Cannata M, *et al.* (2011) The genetic heterogeneity of beta-globin gene defects in Sicily reflects the historic population migrations of the island. *Blood Cells Mol Dis* 46:282-7.
- Goldstein AM, Chan M, Harland M, *et al.* (2007) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 44:99-106.
- Greene MH e Bale SG. "Genetic Aspects of cutaneous malignant melanoma" pag 144-152 in *Epidemiology of Melanoma*. Springer Verlag 1986
- Guo X, *et al.* (2006): Association between multi-level inorganic arsenic exposure from drinking water and skin lesions in China. *Int J Environ Res Public Health* 3 (3): 262-7, 2006.
- Ha L, Ichikawa T, Anver M, *et al.* (2007) ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10968-73.
- Haldorsen T. *et al.* (2001) Reitan JB, Tveten U: Cancer incidence among Norwegian airline cabin attendants. *Int J Epidemiol* 30 (4): 825-30, 2001.
- Harland M, Cust AE, Badenas C, *et al.* (2014) Prevalence and predictors of germline CDKN2A mutations for melanoma cases from Australia, Spain and the United Kingdom. *Hered Cancer Clin Pract* 12:20.

- Harland M, Mistry S, Bishop DT, *et al.* (2001) A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. *Hum Mol Genet* 10:2679-86.
- Harland M, Taylor CF, Chambers PA, *et al.* (2005) A mutation hotspot at the p14ARF splice site. *Oncogene* 24:4604-8.
- Hartman et al. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Apr;72(7):1249-60.
- Hashemi J, Platz A, Ueno T, *et al.* (2000) CDKN2A germ-line mutations in individuals with multiple cutaneous melanomas. *Cancer Res* 60:6864-7.
- Hayward NK (2003) Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 22:3053-62.
- Held M, Bosenberg M Genetic alteration in malignant melanoma. *Diagnostic Histopathology* 16:7, 2010
- Hewitt C, Lee Wu C, Evans G, *et al.* (2002) Germline mutation of ARF in a melanoma kindred. *Hum Mol Genet* 11:1273-9.
- Janxin Shi et al (2014) Rare missense variants in *POT1* predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nature Genetics* 46, 482–486 (2014)
- Jasper I. van der Rhee et al (2011) Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with germline mutation in CDKN2A” *J Am Acad Dermatol* 2011; 65: 281-88.
- Jenkins NC, Jung J, Liu T, *et al.* (2013) Familial melanoma-associated mutations in p16 uncouple its tumor-suppressor functions. *J Invest Dermatol* 133:1043-51.
- Jhappan C, Noonan FP, Merlino G (2003) Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22:3099-112.

- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, *et al.* (1994) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 8:23-6.
- Kosiniak-Kamysz and Agnieszka *et al.* (2014) Increased risk of developing cutaneous malignant melanoma is associated with variation in pigmentation genes and VDR, and may involve epistatic effects. *Melanoma Research* Aug 2014-24-issue 4
- Langard *et al.* (2000) in Incidence of cancer among workers exposed to vinyl chloride in polyvinyl chloride manufacture. *Occup Environ Med* 57 (1): 65-8, 2000)
- Laud K, Marian C, Avril MF, *et al.* (2006) Comprehensive analysis of CDKN2A (p16INK4A/p14ARF) and CDKN2B genes in 53 melanoma index cases considered to be at heightened risk of melanoma. *J Med Genet* 43:39-47.
- Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W, *et al.* (2009) Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J Am Acad Dermatol* 61:677 e1-14- 2009.
- Linee guida Aiom, 2013
- Limon J, Mrozek K. Melanoma, Cytogenetic Studies. Brenner's Encyclopedia of Genetic, 2 edition, vol 4 pag 345-7
- Lynch (2002)
- Liu F, Fu Y, Meyskens FL, Jr. (2009) MiTF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *J Invest Dermatol* 129:422-31.
- Loomis *et al.* (1997) Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls. *Occup Environ Med* 54 (10): 720-8, 1997

- Lundberg et al. (1993) Mortality and cancer incidence among PVC-processing workers in Sweden. *Am J Ind Med* 23 (2): 313-9, 1993
- Mantelli M, Barile M, Ciotti P, *et al.* (2002) High prevalence of the G101W germline mutation in the CDKN2A (P16(ink4a)) gene in 62 Italian malignant melanoma families. *Am J Med Genet* 107:214-21.
- Mantelli M, Pastorino L, Ghiorzo P, *et al.* (2004) Early onset may predict G101W CDKN2A founder mutation carrier status in Ligurian melanoma patients. *Melanoma Res* 14:443-8.
- Maubec E. et al (2012) Familial melanoma: clinical factors associated with germline CDKN2A mutations according to the number of patients affected by melanoma family” *J Am Acad Dermatol* 2012.
- Nelson AA, Tsao H (2009) Melanoma and genetics. *Clin Dermatol* 27:46-52.
- Neil et al. MC1R Genotype Modifies Risk of Melanoma in Families Segregating CDKN2A Mutations *Am J Hum Genet.* 2001 Oct; 69(4): 765–773.
- Nikolaou V, Kang X, Stratigos A, *et al.* (2011) Comprehensive mutational analysis of CDKN2A and CDK4 in Greek patients with cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 165:1219-22.
- Orlow et al (2012) Vitamin D receptor polymorphisms in patients with cutaneous melanoma” *Int J Cancer* 2012 jan 15; 130(2): 405-418
- Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287:821-8.
- Pedace L. et al (2011) “clinical features predicting identification of CDKN2A mutations in Italian Patients with familial cutaneous melanoma” *Cancer Epidemiology* 35 (2011) e116-e120.

- Piepkoprn M (2000) Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressor J AM ACAD DERMATOL may 2000.
- Pukkala et al (2002) Incidence of cancer among Nordic airline pilots over five decades: occupational cohort study. *BMJ* 325 (7364): 567, 2002.
- Pukkala E. et al (2003) Aspholm R, Auvinen A, et al.: Cancer incidence among 10,211 airline pilots: a Nordic study. *Aviat Space Environ Med* 74 (7): 699-706, 2003.
- Puig S, Malveyh J, Badenas C, *et al.* (2005) Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol* 23:3043-51.
- Rane SG, Cosenza SC, Mettus RV, *et al.* (2002) Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22:644-56.
- Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma TRes.* 2012 apr. 22(2): 114-22
- Ron et al (1998) Skin tumor risk among atomic-bomb survivors in Japan. *Cancer Causes Control* 9 (4): 393-401, 1998.
- Sarna T, et al (1980) Cu²⁺ probe of metal-ion binding sites in melanin using electron paramagnetic resonance spectroscopy. II. Natural melanin. *Arch Biochem Biophys* 202 (1): 304-13, 1980.
- Sargen M., et al. Histologic features of melanoma associated with CDKN2A genotype. *J Am Acad Dermatol*, 2014
- Sharpless NE, Kannan K, Xu J, *et al.* (2003) Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene* 22:5055-9.
- SIGU-ONC, Sezione Linee guida, protocolli <http://www.sigu.net>
- Sigurdson (2003) "Cancer incidence in the US radiologic technologists health study, 1983-1998. *Cancer* 97 (12): 3080-9, 2003.

- Son E. et al (2001) First analysis of cancer incidence and occupational radiation exposure based on the National Dose Registry of Canada *Am J Epidemiol* 153 (4): 309-18, 2001
- Soufir N, Avril MF, Chompret A, *et al.* (1998) Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 7:209-16.
- Sturm RA (2002) Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Res* 12:405-16.
- Swick JM, Maize J., Molecular Biology of Melanoma. *J AM Acad Dermatol* 2012; 67: 1049-54
- Telle-Lamberton (2004) Cancer mortality among French Atomic Energy Commission workers. *Am J Ind Med* 45 (1): 34-44, 2004.
- The Breast Cancer Linkage Consortium, Cancer Risks in BRCA2 Mutation Carriers. *JNCI J Natl Cancer Inst*, Volume 91, issue 15, pp 1310-6
- Tsao H, Chin L, Garraway LA, *et al.* (2012) Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 26:1131-55.
- Tsao H, Zhang X, Kwitkiwski K, *et al.* (2000) Low prevalence of germline CDKN2A and CDK4 mutations in patients with early-onset melanoma. *Arch Dermatol* 136:1118-22.
- Udayakumar D, Mahato B, Gabree M, *et al.* (2010) Genetic determinants of cutaneous melanoma predisposition. *Semin Cutan Med Surg* 29:190-5.
- Ugurel S, Houben R, Schrama D, *et al.* (2007) Microphthalmia-associated transcription factor gene amplification in metastatic melanoma is a prognostic marker for patient survival, but not a predictive marker for chemosensitivity and chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 13:
- Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian BC. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* 2008; 5:941-526344-50.

- Veinalde R, Ozola A, Azarjana K, *et al.* (2013) Analysis of Latvian familial melanoma patients shows novel variants in the noncoding regions of CDKN2A and that the CDK4 mutation R24H is a founder mutation. *Melanoma Res* 23:221-6.
- Xu W, Gong L, Haddad MM, *et al.* (2000) Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res* 255:135-43.
- Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, *et al.* (2011) A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 480:99-103.
- Wallace DC, Beardmore, Lesley A. Exton, Familial Malignant Melanoma. *Ann Surg*, Jan 1973
- Ward K (2012) Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature *J AM ACAD DERMATOL* nov 2012
- Wennborg et al (2001) Cancer incidence and work place exposure among Swedish biomedical research personnel. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001 Oct;74(8):558-64.
- Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26:2890-94
- Zuo L, Weger J, Yang Q, *et al.* (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12:97-9.

Presentazioni a congressi e pubblicazione risultati dello studio

I risultati dello studio sono stati presentati:

- al Congresso Nazionale della Società Italiana di Chirurgia Plastica Ricostruttiva ed Estetica (S.I.C.P.R.E.), nella sessione dedicata ai tumori cutanei. Milano Settembre 2015
- come poster, al congresso Nazionale del Melanoma Intergroup Italia (IMI), , Genova, Ottobre del 2015.

Lo studio è stato pubblicato col titolo: "Absence of germline CDKN2A mutation in Sicilian Patients with Familial Malignant Melanoma: could it be a population-specific genetic signature? (Di Lorenzo S. et al) sulla rivista Cancer Biology and Therapy, Dic 2015. (allegato)



FAMILIAL MELANOMA

Screening of CDKN2A gene mutation in Sicilian patients

Sara Di Lorenzo, Daniele Fanale, Bartolo Corradino, Valentina Calò, Gaetana Rinaldi, Adriana Cordova, Antonio Russo.

Introduction:

Germline *CDKN2A* mutations have been described in 10% to 50% of melanoma families from several countries. Sicilian population is genetically different from the people of Europe and Northern Italy because of its historical background, therefore familial melanoma could be due to genes different from high-penetrance *CDKN2A* gene.

Patients and Methods.

Four hundred patients with cutaneous melanoma were observed in a 6-years period at the Plastic Surgery Unit of the University of Palermo. 48 patients have met the criteria of the Italian Society of Human Genetics (SIGU) for the diagnosis of familial melanoma and were screened for *CDKN2A* and *CDK4* mutations. [fig.1]

Results.

Mutation testing revealed that none of the families carried mutations in *CDK4*. **The only carrier of *CDKN2A* germline mutation harboured a rare missense mutation in exon 2, p.R87W [fig.2] instead of the most frequent p.G101W founder described in literature and detected in 60% of familial melanoma cases in Italy (Bruno et al, 2009, Mantelli 2004) . This p.R87W rare missense mutation was found with very low frequency also in other countries belonging to Mediterranean geographical area including Greece (Athens) and Spain (Barcelona) (Harland et al , 2014; Nikolau et al 2011, Puio 2005).**

Conclusions

Unlike other studies, we have not found high mutation rate of *CDKN2A* in patients affected by familial melanoma or multiple melanoma. This difference could be attributed to different factors, including the genetic heterogeneity of the Sicilian population. It is likely that, as in the Australian people, the **inheritance of familial melanoma in this island of the Mediterranean Sea is due to intermediate/low-penetrance susceptibility genes**, which, together with environmental factors (as latitude and sun exposure), could determine the occurrence of melanoma. (Casula et al. 2007-2009)

Criteria for genetic testing:

- Two or more individuals affected by melanoma in the same family (first degree relative);
- Multiple primary melanoma in the same patient with an early age of onset;
- Early-onset melanoma patient and pancreatic cancer in a member of the same family;
- Dysplastic nevus syndrome and a relative with a melanoma.

Fig 1

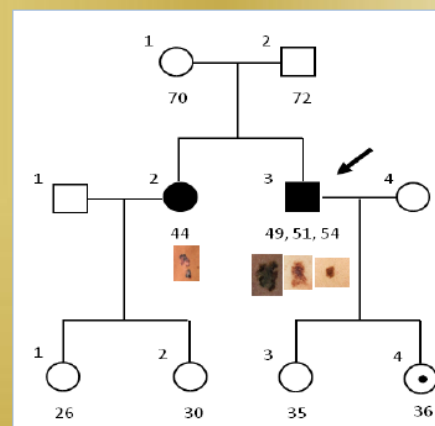


Fig 2

At the age of 49 years the mutation carrier patient had a SSM in the trunk (Breslow 1.9 mm.)
 The proband then developed a second metachronous melanoma at the age of 51 years and a third melanoma at the age of 54 years. Both melanomas were *in situ*.
 proband's sister developed an early-stage melanoma (*in situ*), while his daughter was an unaffected mutation carrier.